

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE

TOME QUATRE-VINGT-QUATRIÈME

Janvier-Juin 1953

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

QR

1

A475

V.84

Jan.-June

1953

PER

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

PARIS — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1953

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LE BACTÉRIOPHAGE

Premier colloque international
ROYAUMONT 1952

SOMMAIRE

	Pages.
Introduction, par ANDRÉ LWOFF.	3
On the structure and osmotic properties of phage particles, by THOMAS F. ANDERSON, CATHERINE RAPPAPORT, and NOAMI A. MUSCATINE.	5
La spécificité de la fixation des phages sur les récepteurs micro- biens, par J. BEUMER.	15
Antigènes entravant l'action de certains bactériophages, par PIERRE NICOLLE, ANDRÉ JUDE et GISÈLE DIVERNEAU.	27
La semi-résistance aux bactériophages, par R. WAHL.	51
Further studies on the membrane of <i>E. coli</i> B, by W. WEIDEL.	60
Chemical and antiviral properties of the somatic antigens of phase II <i>Sh. sonnei</i> and of a phage-resistant variant, 11/3, 4, 7, by WALTHER F. GOEBEL and MARGERIS A. JESAITIS.	66
The rate of inactivation of bacteriophage T4r in specific anti- serum. I. — Salt effect. II. — Cofactor, by N. K. JERNE and LIS SKOVSTED.	73
The fate of the infecting phage particle, by A. F. GRAHAM.	90
Intracellular phases in the reproductive cycle of bacteriophage T2, by A. D. HERSHEY.	99
The production of incomplete bacteriophage particles by the action of proflavine and the properties of the incomplete particles, by R. I. DE MARS, S. E. LURIA, H. FISHER and C. LEVINTHAL.	113

The origin of the components of the bacteriophage particle, by E. A. EVANS Jr.	129
The bases of the deoxyribonucleic acids of T2, T4, and T6 bacteriophages, by G. R. WYATT, and SEYMOUR S. COHEN.	143
Enzymatic activity and bacteriophage infection. III. — Increase of desoxyribonuclease, by ARTHUR B. PARDEE and IDAMAE WILLIAMS.	147
Genetical studies on bacteriophage T1, by CARSTEN BRESCH.	157
The genotypically and phenotypically heat resistant forms in the T5 species of bacteriophage, by MARK H. ADAMS.	164
Variations des bactériophages conditionnées par les bactéries hôtes, par J. J. WEIGLE et G. BERTANI.	175
Genetics of bacteriophage, by N. VISCONTI.	180
Etude du développement du bactériophage au moyen d'irradiations par la lumière ultra-violette, par S. BENZER et F. JACOB.	186
Actions des ultra-violets longs et des visibles courts (3 400-5 500 Å) sur les complexes bactérie-bactériophage, par R. LATARJET et B. MILÉTIĆ.	205
Kinetic studies on the mechanism of photoreactivation of bacteriophage T2 inactivated by ultraviolet light, by GEORGE BOWEN.	218
Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie, par F. JACOB, A. LWOFF, A. SIMINOVITCH et E. WOLLMAN.	222
L'induction, par A. LWOFF.	225
Cationic reversion of induced phage development in <i>Bacillus megatherium</i> , by KENNETH HUYBERS.	242
Influence du régime carboné sur le développement des bactériophages, par FRANÇOIS JACOB.	254
Biochemical modifications of the bacterial host during bacteriophage development, by L. SIMINOVITCH.	265
Infections bactériophagiques secondaires des bactéries lysogènes, par G. BERTANI.	273
Sur le déterminisme génétique de la lysogénie, par E. L. WOLLMAN.	281
Colicines et bactériophages, par P. FREDERICQ.	294
Comparaison entre la biosynthèse induite des bactériophages et de la colicine et entre leur mode d'action, par F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN.	313

LE BACTÉRIOPHAGE

PREMIER COLLOQUE INTERNATIONAL

ABBAYE DE ROYAUMONT

(26 juillet-1^{er} août 1952).

INTRODUCTION

Du 26 juillet au 1^{er} août 1952, s'est tenu à Royaumont, près de Paris, le premier Colloque international consacré au Bactériophage. Il a été organisé grâce à l'appui de l'Union Internationale des Sciences Biologiques, patronnée elle-même par l'U.N.E.S.C.O.

L'abbaye de Royaumont, fondée au xiii^e siècle par Blanche de Castille, achevée par Saint Louis qui ne cessa de s'y intéresser, fut l'une des grandes abbayes cisterciennes. Elle a joué un rôle notable dans l'histoire de la France. Aujourd'hui désaffectée, elle abrite le Centre Culturel International. J'exprime la gratitude de tous à son Directeur, M. Gilbert Gadoffre, qui a bien voulu nous donner l'hospitalité. Ainsi, les participants au Colloque ont vécu en commun, durant une semaine, dans un cadre d'une grande beauté, dont l'harmonie, le charme austère et le pouvoir d'incantation contribuent à créer un climat particulièrement favorable au travail et aux relations personnelles.

Tous ceux qui ont suivi les publications relatives au bactériophage connaissent l'importance des progrès réalisés depuis une dizaine d'années dans les domaines les plus variés : morphologie, biologie, développement, génétique, physiologie, biochimie, action pathogène. Ces progrès sont l'œuvre de chercheurs venus d'horizons différents, aux connaissances, aux conceptions et aux formes d'esprit très diverses. La confrontation des faits, des idées et des personnalités ne pouvait manquer d'engendrer des réactions intéressantes. Quoi qu'il en ait été, les données et les vues, anciennes ou nouvelles, furent, durant quelques jours, soumises à un brassage intense. Ce fascicule n'en offre, malheureusement, qu'une image incomplète. A mon grand regret, il n'a pas été

possible, en effet, de faire état des discussions, qui furent nombreuses et animées. Tel qu'il se présente, cependant, le compte rendu de nos travaux constitue un ensemble important de mémoires originaux et de mises au point.

Je suis certain de traduire la pensée de tous en adressant le témoignage de notre reconnaissance à M. J. Tréfouël, directeur de l'Institut Pasteur, et à M. P. Lépine, rédacteur en chef des *Annales*, qui ont bien voulu accepter de publier cette Somme bactériophagique.

Un colloque est une manière de complexe symbiotique dont tous les éléments tirent profit de l'apport commun. A Royaumont, chacun joua son personnage avec beaucoup de naturel. Ainsi furent généreusement dispensées, sous une forme généralement assimilable, des nourritures préparées avec art. C'est pour moi un agréable et amical devoir de remercier ici tous ceux qui furent les artisans de cette réussite.

ANDRÉ LWOFF.

ON THE STRUCTURE AND OSMOTIC PROPERTIES OF PHAGE PARTICLES (1)

by THOMAS F. ANDERSON, CATHERINE RAPPAPORT, and NOAMI A. MUSCATINE.

*(Johnson Foundation, University of Pennsylvania,
Philadelphia, U. S. A.)*

Particles of the related bacteriophages T2, T4 and T6 consist of a number of recognizable elements arranged to give them the shape of a tadpole. Each has a « tail » about 1 000 Å long and 200 Å thick attached to a « head » some 600 Å wide and 800 Å long. When dried by the critical point method [1] (to eliminate artifacts due to surface tension) the head is a hexagonal prism capped by a 120° pyramid or cone at one end and blending into the tail structure at the other.

When dried by the critical point method the head has a uniform density as seen (pl. 1 *a*) in the electron microscope rather than the granular structure that is observed in air-dried preparations [2]. This, however, does not mean that the head is structurally homogeneous. On the contrary, much as a red cell can be lysed by suitable treatments, it, too, can be caused to liberate its contents into the surrounding medium to leave behind an empty membrane. For example, when a T2 concentrate is heavily irradiated with ultraviolet light, the suspension becomes viscous and loses its characteristic blue Tyndall scattering as well as its infectivity. In the electron microscope such a treated suspension is seen to contain « ghosts », i. e., phage particles of normal size and shape, but lacking the internal structure of the head. It was inferred from these experiments [2] that the head of these bacteriophages consists of a membrane surrounding an internal structure which is rather easily removed. Greatly distorted ghosts are obtained when T2 in salt solution is allowed to dry on a sup-

(1) This work was supported by a contract between the Office of Naval Research, Department of the Navy and the University of Pennsylvania.

porting membrane for electron microscopy and then washed with water to remove the salt [3].

I. THE PRODUCTION OF PHAGE GHOSTS BY OSMOTIC SHOCK WITH SODIUM CHLORIDE. — When concentrated suspensions of T2, T4, or T6 are incubated with 4 M NaCl and then added with rapid mixing to distilled water, the blue Tyndall scattering due to the virus particles as well as the plaque-forming activity disappears in contrast to control tests in which the mixing is carried out slowly [4]. In the electron microscope the control particles appeared normal while particles in rapidly diluted suspensions become ghosts [5]. After being dried by the critical point method the hollow heads of these ghosts still tend to retain the prismatic structure of the original particles (pl. 1 *b*). This peculiar shape must then be due, at least in part, to the head membranes of the particles which are measured to be only 125 Å in thickness. Herriott [6] has shown that the ghosts contain no desoxypentose nucleic acid. Since the infectious particle contains 37 percent desoxypentose nucleic acid [7], it may be inferred that the material so easily removed from the head is mainly, and possibly only the nucleic acid of the particle.

Tests on the other viruses in the T set have shown [5] that T1, T3, and T7, which have no visible membranes, survive sudden drops in osmotic pressure of NaCl. The virus T5 survives also but it is interesting that in this case the material in the head escapes spontaneously at 45° C in the absence of calcium ion to leave a ghost consisting of a hollow head membrane with the tail attached [4].

The results with the even-numbered viruses are compatible with the view that the membranes of their heads are somewhat permeable to NaCl but much more permeable to water molecules. Thus when the virus is placed in concentrated NaCl, the salt slowly enters the head and water leaves it until internal and external activities are equal. Then when the virus is placed in distilled water the activities again tend to become equal by diffusion of the salt out of the heads and the much more rapid diffusion of the water into the heads. The resulting inward flow of matter would result in a transient increase in the hydrostatic pressure within the head; if the decrease in ambient salt concentration is large enough and fast enough this diffusion pressure would open a hole in the structure through which the nucleic acid escapes. The phenomenon may thus be somewhat similar to the osmotic swelling and hemolysis of red blood cells exposed to reduced salt concentrations. However, since the suddenness of dilution is

essential for the destruction of virus particles, the phenomenon has been termed « osmotic shock » to distinguish it from hemolytic phenomena. As yet we cannot tell whether the nucleic acid escapes through the tail or through a hole opened in the head.

II. DEPENDANCE OF SURVIVAL ON SALT CONCENTRATION. — As seen in curve A of fig. 1, the survival of T6r to osmotic shock is a function of the concentration of the salt solution with which the virus has been incubated before dilution. At concentrations of NaCl below 1.5 M, negligible amounts are inactivated, but above this critical concentration at which the osmotic pressure is 70 atmos-

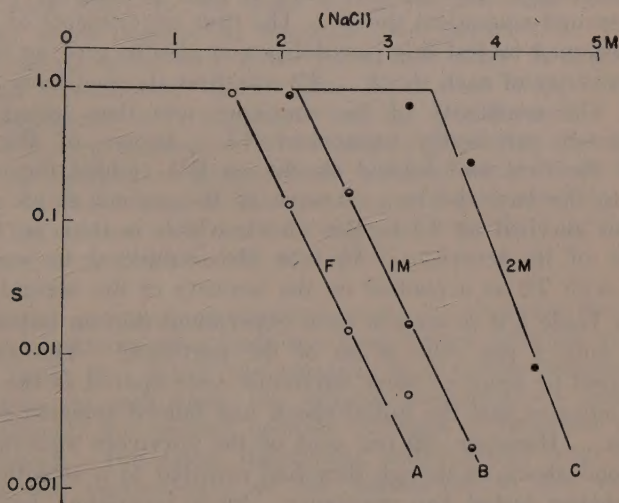


FIG. 1. — The survival of T6rS as a function of the concentration of NaCl with which it had been inoculated before sudden dilution in various media.

Procedure. — One tenth ml. samples of virus suspended in NaCl solutions of various concentrations were placed in *separate* large test tubes at room temperature for at least 15 min. Into each was then dumped 10 ml. of diluting medium from other large test tubes. After thorough mixing, the suspensions were assayed for plaque counts. The logarithm of the survival (S) is here plotted against the molar concentrations of NaCl with which the virus had been incubated.

It is seen that the virus in NaCl survives dilution by F medium (curve A) until a critical concentration of NaCl has been reached above which the survival decreases logarithmically as the NaCl concentration is increased. 1 M MgSO_4 in the diluting medium (curve B) protects the virus from shock until a higher critical concentration of NaCl has been reached, while 2 M MgSO_4 (curve C) exhibits a still greater protective action.

pheres, the logarithm of the survival decreases rapidly as the salt concentrations are increased. The slope of the curve might reflect differences in the rates of dilution of individual particles in the diluting procedure. It could also reflect an inhomogeneity in the population with respect to the sensitivity of the particles to osmotic shock. That inhomogeneities exist is shown in the following experiments.

III. INHOMOGENEITY OF PHAGE STOCKS. — A. *The Selection of Shock-Resistant Particles of T2 and T4.* — If the particles which survive a given initial shock are truly different from those which were inactivated they should show a high probability of surviving a second equivalent shock. The four experiments of Table I were designed to test this possibility and also to give an estimate of the severity of each shock. T2 was first shocked from 3 molar NaCl. The sensitivity of the survivors was then tested in the presence of previously unshocked T4. Assays of the survivors of the first and second shocks on B/4 yielded the survival of T2 to the two shocks. Assays of the second shock on B/2 gave the survival of T4 to this shock which is thus an internal measure of its severity. T4 was also subjected to successive shocks with T2 as a control on the severity of the second shock.

From Table I it is seen in each experiment that an initial shock spared only 1 per cent or so of the particles. The fact that 10 per cent or more of these survivors were spared in the second shock indicates that the initial shock had indeed selected resistant particles. However, 90 per cent of the survivors succumbed to the second shock as though they had reverted to a sensitive form before being tested for resistance. Such reversions have been studied directly in a remarkable stock of T6r where the sensitivity can be varied at will by adjusting the temperature.

B. *The Effect of Temperature on the Shockability of T6r.* — After sudden dilution of T6r in 2.2 M NaCl at various temperatures, the survival was found to increase with temperature until at 55° almost all the virus survived. Preparations of T6r which had been heated to 55° even survived shock by 5 M NaCl. The temperature of the diluting medium had only a minor effect on the survival. However, if heated suspensions were later cooled to various temperatures they recovered their sensitivity to shock with a half time of some 10 minutes at 37° and a day or so at 0°.

It thus appears that T6r exists in two forms, a low temperature form, T6rS, which is sensitive, and a high temperature form, T6rR, which is resistant to osmotic shock by NaCl. The fraction of

the population surviving shock by 5 M NaCl at the instant of test would then represent the fraction in the « R » state.

The equilibrium constant,

$$K = (T6rR)/(T6rS),$$

was found to be equal to 0.1 at about 36°, 1.0 at about 42°, and 10 at about 48° in 2.2 M NaCl at pH 7. This temperature coefficient corresponds to a ΔH of about 80,000 cal. or a ΔS of 250 cal./deg.; even higher values would be applicable if the tested population should prove to be inhomogeneous. Such a large value of ΔS means that the transition $T6rS \rightarrow T6rR$ involves an increased randomization of a large number of elements in each particle. In other words the particles of $T2rR$ have many more degrees of freedom than particles of $T2rS$; or on an atomic scale they differ from each other to a greater extent than particles of $T2rS$ differ from each other. As a working hypothesis it is supposed that the transformation from sensitive « S » to resistant « R » forms involves the opening of pores in the limiting structure of the particle which make it so permeable to NaCl that it can no longer be shocked by this solute. This concept receives some support from the behavior of $T6r$ in sucrose as discussed in Section V.

IV. OSMOTIC SHOCK BY DIFFERENT SOLUTES. — Osmotic shock of $T6rS$ from a number of solutes has been tested with the results listed in Table II. While the survival is a similar function of concentration in each case, the critical concentrations and, of greater interest, the critical osmotic pressure decrements (ΔP) were different. The latter differences could result from differences in the permeability of the membrane to the various solutes. They could also reflect effects which the solutes themselves might have on the limiting structures in making them more or less permeable, and on their contents in making their escape more or less easy.

All of the above results were obtained by diluting the incubated virus in water or in the dilute salts in F medium whose osmotic pressure is only three atmospheres. Additional experiments have shown that the presence of more salt in the diluting medium protects the particles from shock until correspondingly higher critical concentrations are reached. Thus, as seen in curves B and C of fig. 1, 1 M $MgSO_4$ in the diluting medium raises the critical concentration of NaCl to 2.1 M while 2 M $MgSO_4$ raises the critical concentration to 3.5 M. Subtracting the osmotic pressures of the $MgSO_4$ solutions from those of the corresponding NaCl solutions gives ΔP , the decrement in osmotic pressure as listed in Table II. The fact that the critical decrement in

osmotic pressure is dependent on the MgSO_4 concentration suggests again that a simple theory based on considerations of osmotic pressures alone would not account for the data.

In each of the experiments cited, control dilutions of T6rS in the solute under test were made in 2 M MgSO_4 to protect the particles from shock. Assays of these suspensions served to show whether shock had inactivated the particles in the rapid experimental dilutions or whether the high solute concentrations *per se* had destroyed the activity. In every case but that of sucrose it could be shown that the killing of the phage had been due to shock and not to the direct action of the solute.

V. THE BEHAVIOR OF T6rS AND T6rR IN SUCROSE. — In 4.2 M sucrose T6rS lost its infectivity immediately and all attempts to recover virus activity by slow dilution from such concentrated sucrose solutions failed. On the other hand, the high temperature form, T6rR, after incubation at 55° in 2.2 M NaCl and 0.2 ml of the detergent Tween 80 per liter, is not inactivated directly by 4.2 M sucrose : a large proportion of these particles is able to form plaques after dilution in 2 M MgSO_4 . However, after rapid dilution in F medium, these particles are inactivated.

The latter result is consistent with the view that the envelope of T6rR is sufficiently permeable to admit sucrose molecules, but impermeable enough to cause a high diffusion pressure when rapidly diluted from concentrated solutions. The envelope of T6rS, on the other hand, may be so impermeable to sucrose that concentrated solutions dehydrate and irreversibly deform the particle.

VI. THE FUNCTIONAL ANATOMY OF THE T-EVEN PHAGES. — A concept of the functional anatomy of the even-numbered phage particle is indicated schematically in fig 2. That the tip of the tail functions as the site of attachment to host cells is evident from electron microscope pictures of infected cells in which all the virus particles are attached by their tails [4]. The fact that DNA-free ghosts produced by osmotic shock are able to kill host cells without multiplying [6] suggests that the DNA contained within the head is essential to virus multiplication ; indeed Hershey [8] has shown that all the DNA of normal particles is transferred to host cells in forming the virus-host complex. On the other hand, most of the protein can be sheared off the complex by violent agitation without affecting its fertility [8]. and Levinthal [9], examining this protein in the electron microscope, finds it to consist of ghosts with somewhat shortened tails as though part of the tip had been left attached to the complex. It is evident then that most of the protein of the infecting particle

is disposable once an active complex has been formed. One is tempted to look at the phage particle as a syringe whose bulb is packed with DNA ready to be injected when the tip becomes specifically attached to a host cell. However, the mechanism of injection is still obscure.

Addendum : THE MORPHOLOGY OF IMMATURE T2 PARTICLES. — When *E. coli* B is infected with T2 and incubated in the presence of proflavine, lysis occurs at the normal time, but no active

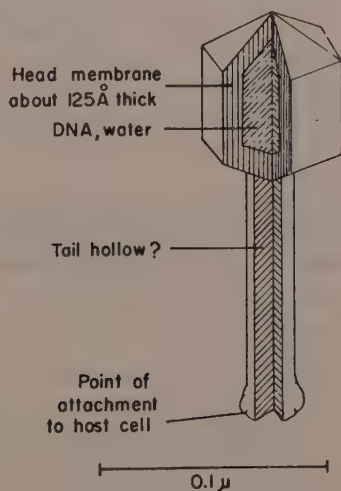


FIG. 2. — A schematic drawing of a T2 particle with one sector of the hexagonal head cut away.

daughter particles are produced [40]. Instead, a sedimentable fraction is formed, a sample of which DeMars and Luria [41] sent us for examination by the critical point method in the electron microscope. We have found this protein to consist of hollow structures having the characteristic morphology of T2 heads with little internal structure and without attached tails (pl. 1 c). This suggests that the head membrane may have an important intracellular role to play in the development and maturation of the particle.

SUMMARY

1° When the phages T2, T4 or T6 are placed in concentrated solutions of NaCl or most other solutes and then diluted rapidly

they lose their infectivity. Infectivity is retained if the dilution is carried out slowly. The inactivation phenomenon is termed « osmotic shock ».

2° In the electron microscope these shocked particles are seen to have become « ghosts », i. e., normally shaped particles lacking the internal structure of the head (DNA). The head membrane is about 125 Å thick.

3° Populations of phage are heterogeneous with respect to sensitivity to osmotic shock : particles of T2 or T4 which have survived an initial shock are more resistant than the parent population. In a stock of T6r, a temperature-dependent equilibrium exists between sensitive and resistant forms, the latter form predominating above 42°.

4° Concentrated sucrose inactivates the sensitive phages directly, but not the resistant forms which can then be shocked by rapid dilution.

TABLE I. — *The survival of T2 and T4 to successive equivalent osmotic shocks.*

EXPERIMENT	SURVIVAL		
	T2 (initial shock)	T2 (second shock)	Admixed T4 (initial shock)
1	0,0094	0,14	0,0074
2	0,0045	0,13	0,029

EXPERIMENT	SURVIVAL		
	T4 (initial shock)	T4 (second shock)	Admixed T2 (initial shock)
3	0,0048	0,097	0,0026
4	0,0011	0,27	0,0068

Procedure. — Two-tenths ml. of a T2 concentrate were mixed with 0.2 ml. of 6 molar NaCl solution and the resulting mixture was shocked by dumping 10 ml. of water on it. To 0.1 ml. of this shocked T2 suspension were then added 0.1 ml. of a suspension of T4 of about the same concentration and 0.2 ml. of 6 molar NaCl. Ten ml. of water were then dumped into this mixture. The survivors were then assayed on indicator strains, B/2 and B/4, and compared with assays of unshocked controls in which distilled water replaced the 6 molar NaCl.

An analogous procedure was followed in determining the survival of T4 to successive shocks.

TABLE II. — *Osmotic shock of T6rS by various solutes.*

SOLUTE	DILUTING MEDIUM	CRITICAL Concentration (molal)	CRITICAL Decrement in Osmotic Pressure, ΔP (Atmospheres)
NaCl	F (P = 3 Atm.).	1.5	68
KCl.	Water.	1.4	62
MgCl ₂	F.	1.05	83
Li ₂ SO ₄	F.	1.2	70
Glycerol	F.	2.15	55
NaCl	1M MgSO ₄ (P = 26 Atm.).	2.15	77
NaCl	2M MgSO ₄ (P = 65 Atm.).	3.5	123
MgSO ₄	Water.	> 2.12	> 71

The procedure followed was essentially that outlined in the legend of fig. 1. From plots of the log (survival) *vs* solute concentration, the critical concentrations for inactivation by osmotic shock were obtained. Osmotic pressures, P, were estimated by interpolation of data on the osmotic coefficients of the solutes: NaCl and KCl (R. H. Stokes and B. J. Levien, *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 333); MgCl₂ (R. H. Stokes, *Trans. Faraday Soc.*, 1945, **41**, 642); Li₂SO₄ (R. A. Robinson, J. M. Wilson and R. H. Stokes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 1011); MgSO₄ (R. A. Robinson and R. S. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1936, **58**, 959); glycerol was assumed to have values equal to those for sucrose (E. R. B. Smith and P. K. Smith, *J. Biol. Chem.*, 1937, **117**, 209).

5° These results suggest that the envelope of the sensitive forms is somewhat less permeable to most solutes than to water, but is quite impermeable to sucrose which dehydrates the particle; and that the resistant form is almost as permeable to most solutes as to water, but only moderately permeable to sucrose. Shock is pictured as the building up of excessive diffusion pressure in the head which ruptures the envelope and releases the DNA.

6° The larger particles liberated from lysis of T2-infected bacteria incubated in proflavine appear to be essentially empty phage heads with thickened walls and with no tails attached.

7° The functional anatomy of these phages is discussed briefly.

BIBLIOGRAPHY

- [1] T. F. ANDERSON. *Am. Nat.*, 1952, **86**, 91.
- [2] T. F. ANDERSON. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1945, **25**, 1; *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1946, **11**, 1.
- [3] A. E. HOOK, DOROTHY BEARD, A. R. TAYLOR, D. G. SHARP and J. W. BEARD. *J. Biol. Chem.*, 1946, **165**, 241.
- [4] T. F. ANDERSON. *Bot. Rev.*, 1949, **15**, 464.
- [5] T. F. ANDERSON. *J. Applied Phys.*, 1950, **21**, 70.

- [6] R. M. HERRIOTT. *J. Bact.*, 1951, **61**, 752.
- [7] S. S. COHEN and T. F. ANDERSON. *J. Exp. Med.*, 1946, **84**, 511.
- [8] A. D. HERSHEY and Martha CHASE. *J. Gen. Physiol.*, 1952, **36**, 39.
- [9] C. LEVINthal. *These Annales*, 1953, **84**, 113.
- [10] Ruth A. C. FOSTER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 795.
- [11] R. I. DEMARS, S. E. LURIA, H. FISCHER and C. LEVINthal. *These Annales*, 1952, **84**, 00.

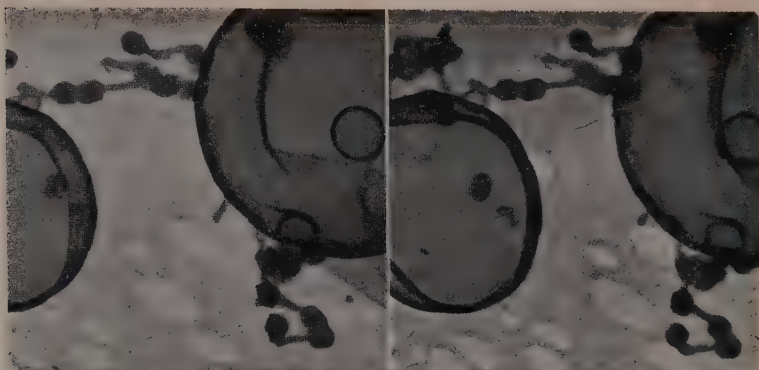
PLATE I

a) A stereoscopic pair of electron micrographs of a mixture of T2r+ particles and boiled ghosts of *E. coli* B, fixed in osmic acid vapor and dried by the critical point method [4] to show the three-dimensional morphology of the particles. The visible particles are not physiologically adsorbed on the ghosts, but adhere to them and to each other in a more or less random fashion. Particles which remain entirely free during the drying process escape from the preparation and, of course, are not seen. EMG 5/17/51 Bce printed on low contrast paper ; X 46 000. Stereoscopic angle 12°.

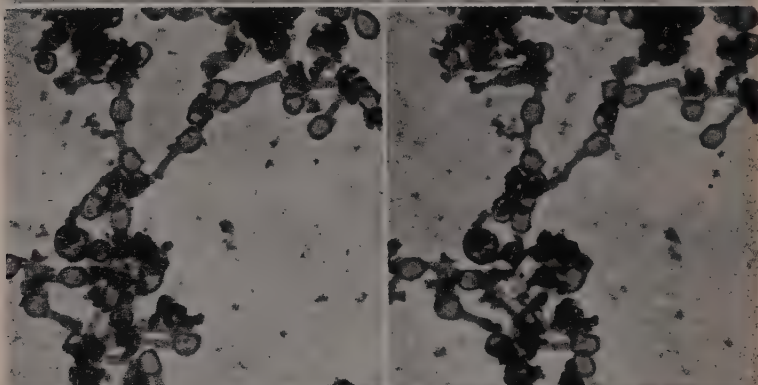
b) A cluster of ghosts of T4r particles which had been shocked by sudden dilution from concentrated NaCl solution and dried by the critical point method. The membranes of the now empty heads tend to retain the hexagonal shape of the original particles. EMG 9/25/51 Cbc printed on high contrast paper ; X 46 000. Stereoscopic angle 12°.

c) Non-infectious particles and debris produced by lysis of *E. coli* B by T2 in the presence of proflavine and dried by the critical point method. The morphology is similar to that of the phage head, but with thicker walls and essentially lacking in internal matter. EMG 8/12/52 Ccd.

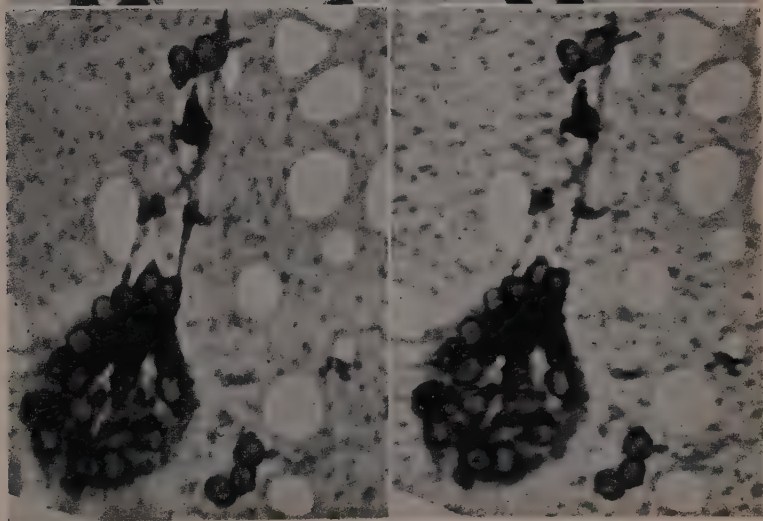
a



b



c



LA SPÉCIFICITÉ DE LA FIXATION DES PHAGES SUR LES RÉCEPTEURS MICROBIENS

par J. BEUMER.

(Institut Pasteur de Bruxelles.)

La lyse des bactéries par les phages pose à l'esprit bien des questions énigmatiques, mais l'un des aspects les plus frappants du phénomène est sa spécificité. Pourquoi de deux bactéries très voisines, l'une est-elle sensible, l'autre résistante à un même bactériophage ? Les raisons de cette différence peuvent *a priori* paraître multiples — et elles le sont sans doute —, mais le fait que le phage est fixé par la bactérie sensible et non par celle qui est résistante indique clairement que la condition première de la sensibilité du germe au phage consiste en la possibilité pour la bactérie d'absorber la particule lytique. La fixation du phage par la bactérie sensible est la première des réactions, dont la succession dans la bactérie assure la reproduction du phage ; on peut concevoir que l'une ou l'autre des réactions subséquentes avorte, et imaginer ainsi d'autres causes à la résistance bactérienne aux phages, mais il n'en reste pas moins que la reproduction de ceux-ci ne peut débiter que par l'absorption de la particule de phage par la bactérie et il paraît, par conséquent, logique de supposer, que c'est de la possibilité pour la bactérie d'effectuer cette réaction initiale que dépend au premier chef sa sensibilité au bactériophage.

Mettre en évidence, chez les bactéries sensibles à un phage, un élément commun à tous les germes sensibles à ce phage et qui ferait défaut chez les bactéries résistantes, et donner la preuve matérielle de son existence en l'isolant de la bactérie, telles étaient les étapes de la démonstration à effectuer. Burnet [1] accomplit la première en montrant que chez les *Salmonella* la sensibilité à un même phage, de bactéries appartenant à des types divers, est liée à la présence chez ces germes du même antigène somatique. Levine et Frisch [2], par ailleurs, réussirent à extraire des germes sensibles à un phage une substance capable de se combiner à lui et de lui enlever par là le pouvoir de se fixer sur les bactéries sensibles.

On peut donc admettre que le phage se fixe sur un constituant

déterminé de la bactérie sensible, auquel on a donné le nom de récepteur. C'est la possession du récepteur approprié qui conditionne la sensibilité d'une bactérie à un phage donné et c'est la fixation du phage sur le récepteur qui, en lui ouvrant l'accès du germe, permet éventuellement à l'agent lytique de détourner à son profit le métabolisme de la bactérie et de se reproduire, cette ultime conséquence n'étant cependant pas fatalement déterminée par la réalisation de la condition initiale nécessaire qu'est la fixation.

Nos recherches nous ayant fourni quelques exemples du rôle primordial, que joue la spécificité des récepteurs bactériens dans la sensibilité des bactéries aux bactériophages, il nous a paru utile de réunir des données, déjà publiées ailleurs pour la plupart, mais qui sont groupées pour la première fois, dans le but de présenter l'ensemble des arguments qui, croyons-nous, permettent de penser qu'il faut voir dans les récepteurs bactériens les facteurs essentiels de la spécificité d'action des phages.

Au début de nos recherches [3], nous avons eu la bonne fortune de disposer de deux bactériophages ayant des spectres d'activité d'étendue très différente : l'un (pfi) ne lyse, en effet, que la forme S du coli ϕ , tandis que l'autre (PF) lyse à la fois la forme S et la forme R de ce colibacille, ainsi que plusieurs souches de bacilles dysentériques, parmi lesquelles nous avons particulièrement étudié une souche de bacille de Shiga. Or on constate que le phage pfi n'est inactivé que par un extrait du coli ϕ S, qui seul est sensible à l'action de ce phage, tandis que le phage PF, actif sur les colis ϕ S et ϕ R et sur le bacille de Shiga, est inactivé par des extraits provenant de ces trois germes (tableau I). Il semble donc que seuls les extraits des germes sensibles à l'action d'un phage contiennent le récepteur spécifique correspondant, capable d'absorber le phage et d'empêcher sa fixation ultérieure sur la bactérie ; par contre, les extraits

TABLEAU I.

PHAGES	COLI ϕ S			COLI ϕ R			B. SHIGA		
	Sensibilité	EL/L3	EB	Sensibilité	EL/L3	EB	Sensibilité	EL/L3	EB
pfi.	+	Inhib.	0	0	0	0	0	0	0
PF.	+	0	Inhib.	+	0	Inhib.	+	0	Inhib.

EL/L3, extrait en eau physiologique, filtré sur L3; EB, extrait alcalin.

des bactéries résistantes à ce même phage sont dépourvus du récepteur approprié et corrélativement incapables de fixer et d'inactiver ce phage.

On constate, par ailleurs, que les deux phages actifs sur le coli ϕ S sont inhibés par des extraits différents du même germe : en effet, l'extrait EL/L3 inhibe le phage pfi et non le phage PF, et, inversement, ce dernier est inhibé par l'extrait EB, qui ne fixe pas le phage pfi. On peut donc, par des procédés différents, extraire d'une même bactérie, sensible à deux phages distincts, deux récepteurs dont chacun fixe spécifiquement le phage correspondant : à chaque phage actif sur la bactérie correspond donc un récepteur distinct, que l'on peut isoler. Le tableau II résume les propriétés des deux récepteurs différents, qui répondent chez le coli ϕ S l'un au phage pfi, l'autre au phage PF. Le récepteur de pfi s'extrait des bactéries par simple lavage en eau physiologique (extrait EL/L3), tandis que celui de PF s'obtient en laissant séjourner vingt-quatre heures à pH 10 les bactéries traitées au préalable par l'acide trichloracétique N/2 à froid (extrait EB). Ces deux récepteurs diffèrent en outre par leurs propriétés chimiques, leur filtrabilité et leurs caractères immunologiques (tableau II).

TABLEAU II. — Caractères distinctifs des récepteurs de pfi et PF extraits du coli ϕ S.

Récepteur de pfi.	Récepteur de PF.
Extraction par lavage des bactéries en eau physiologique.	Extraction à pH 10 des bactéries traitées au préalable par acide trichloracétique N/2.
Non précipitable par acide trichloracétique à pH 3,5.	Précipité par acide trichloracétique à pH 3,5.
Inactivé par acide trichloracétique N/2.	
Précipité par 10 vol. d'alcool à 94°.	
Filtre sur Chamberland L3.	Ne filtre pas sur Chamberland L3.
	Filtre sur gradocol 400 m μ .
Précipité par sérum anti- ϕ S unique-ment,	Précipité par sérum anti- ϕ S, anti- ϕ R et anti-Shiga.

En collaboration avec P. Bordet [4], nous avons pu mettre en évidence, de façon particulièrement frappante, la corrélation qui existe entre l'élaboration du récepteur par la bactérie et la sensibilité de cette dernière au phage correspondant. Lorsque l'on cultive du coli ϕ S à une température inférieure à 20°, son type antigénique se modifie et il perd sa sensibilité au phage pfi [5]. Or nous avons pu montrer que le coli ϕ S cultivé à basse température est dépourvu du récepteur du phage pfi, ce qui explique son insensibilité à ce phage, mais qu'il continue à élaborer le récepteur du phage PF, auquel il demeure sensible. La modifi-

cation antigénique étant réversible, la bactérie reportée à 37° élabore de nouveau le récepteur de pfi et récupère en même temps sa sensibilité vis-à-vis de ce phage (tableau III).

Dans des recherches, encore en cours actuellement, M. P. Beumer-Jochmans et moi, nous avons reconnu l'existence chez

TABLEAU III.

GERME	EXTRAIT	INHIBITION du phage	1 ^{er} PASSAGE à 37° p. 100	1 ^{er} PASSAGE à 15° p. 100	2 ^e PASSAGE à 37° p. 100	2 ^e PASSAGE à 15° p. 100
Coli φ S . . .	EL/L3	pfi	99,5	0	99	0
	EB	PF	97,5	80	97,5	90
Coli φ R . . .	EL/L3	pfi	0	0	0	0
	EB	PF	97,5	97,5	90	97,5

deux souches de bacilles dysentériques (Y6R et Flexner 6) de récepteurs distincts, correspondant au phage PF et aux divers phages que libère le bacille lysogène de Lisbonne. Le tableau IV résume les premiers résultats obtenus. La souche Y6R paraît posséder au moins 3 récepteurs distincts, l'un pour PF dans l'extrait EB, le second correspondant au phage G et au phage H+ (phages qui ainsi que nous l'avons montré ailleurs [6] paraissent identiques), surtout abondant dans l'EL/L3 et moins dans l'extrait EB, le troisième enfin pour le phage P, que nous n'avons pas réussi à isoler du germe jusqu'à présent, mais qui diffère certainement des deux premiers, puisqu'il ne se trouve dans aucun des extraits qui contiennent les récepteurs de PF ou de G. La souche Flexner 6, sensible à un plus grand nombre de phages, possède elle aussi plusieurs récepteurs distincts : 1° celui

TABLEAU IV.

PHAGES	Y 6 R		FLEXNER 6	
	Sensibilité	Extraits inhibiteurs	Sensibilité	Extraits inhibiteurs
PF	+	EB	+	EB
G	+	EL/L3 (EB)	+	EL/L3 EA
P	+	Non encore isolé.	+	Non encore isolé.
H +	+	EL/L3 (EB)	+	EL/L3 EA
H -	\pm ?	?	+	Non encore isolé.
V	\pm ?	?	+	EA EB

de PF dans l'extrait EB ; 2° le récepteur du phage G = H + dans l'EL/L3 et l'antigène glucido-lipidique (EA), 3° le récepteur du phage V, que l'on trouve à la fois dans l'extrait EB et dans l'antigène glucido-lipidique ; les récepteurs des phages P et H — n'ont pu être isolés jusqu'à présent, mais différent des précédents, en ce qu'ils ne se trouvent pas dans les extraits étudiés. L'identification de ces divers récepteurs n'est pas terminée et exige de nouvelles recherches en cours d'exécution, mais on constate que les résultats acquis offrent un nouvel exemple de la spécificité des récepteurs, qui chez un même germe répondent à des phages différents.

Le tableau V montre que, réciproquement, lorsque plusieurs germes sont sensibles à un même phage, celui-ci est fixé par le récepteur correspondant, extrait de l'un quelconque des germes sensibles. C'est ainsi que, par exemple, l'extrait EB de coli ϕ S, qui contient le récepteur du phage PF, inhibe l'action de celui-ci non seulement vis-à-vis du coli ϕ S, mais encore du coli ϕ R et du bacille de Shiga [3]. Les récepteurs d'un même phage, isolés des diverses bactéries sensibles à ce phage, sont donc fonctionnellement interchangeables et l'on peut expliquer la commune sensibilité de bactéries différentes à un même phage par la présence chez ces bactéries de récepteurs spécifiques, qui sans être identiques, ainsi que nous le verrons, sont du moins équivalents du point de vue de leur capacité de fixer le phage correspondant.

TABLEAU V.

RÉCEPTEUR DE PF	INHIBITION de PF sur ϕ S p. 100	INHIBITION de PF sur ϕ R p. 100	INHIBITION de PF sur Shiga p. 100
Extrait de ϕ S.	90 à 94	99	99
Extrait de ϕ R.	90 à 99	99	90 à 99
Extrait de Shiga	90	90	90

Si la sensibilité des bactéries aux phages dépend de la présence chez elles de récepteurs spécifiques, on peut montrer que dans de nombreux cas la résistance d'un germe à un phage déterminé résulte de l'absence du récepteur approprié : c'est ainsi que l'extrait du bacille de Shiga, insensible au phage pfi, est dépourvu de la propriété de fixer ce phage : le récepteur de pfi fait défaut chez cette souche (tableau I). De même, la variété R du coli ϕ ne possède pas le récepteur du phage pfi, auquel elle est insensible, alors que la forme S, dont elle dérive, est tout à la fois pourvue de ce récepteur et sensible au phage correspondant.

On sait que les cultures secondaires, qui se développent après action d'un phage sur une souche sensible, sont constituées de germes résistants à ce phage : or, avec P. Bordet [7] nous avons montré que les extraits de ces germes résistants sont dépourvus de la propriété, que possèdent les extraits de la souche sensible originelle, de fixer le phage qui les a sélectionnés. En effet, si l'on fait agir du phage PF sur du coli ϕ S, on voit se développer, après la lyse de la culture sensible par le phage, une culture secondaire qui se montre résistante à PF ; corrélativement, les extraits préparés aux dépens de cette culture secondaire, résistante au phage, sont dépourvus du pouvoir de le fixer. Le passage d'une culture de la sensibilité à la résistance, sous l'action du phage, résulte donc de la sélection, au sein de la population bactérienne, des individus dépourvus du récepteur correspondant à ce phage (tableau VI).

TABLEAU VI.

GERME	SENSIBILITÉ		FIXATION SUR AB5	
	au phage PF	à la colicine FVN	du phage PF	de la colicine FVN
ϕ S normal . . .	+	+	+	+
ϕ S/PF	0	+	0	+
ϕ S/FVN	+	0	+	0

Avec L. Quersin [8], nous avons montré que la spécificité des récepteurs peut être très étroite dans certains cas. C'est ainsi que le coli ϕ R, résistant au phage PF 1, reste sensible à un mutant de ce phage (PF 2), qui se distingue du phage originel par son spectre d'activité et partiellement par ses caractères antigéniques ; réciproquement, le coli ϕ R résistant à PF 2 reste sensible à PF 1. On constate que corrélativement les extraits de ϕ R résistant à PF 1 (ϕ R/PF 1) ne fixent plus PF 1, mais fixent encore PF 2, et que les extraits de ϕ R/PF 2, dépourvus d'action inhibitrice pour PF 2, sont encore capables d'inhiber PF 1 (tableau VII). La sensibilité de la bactérie à ces deux phages étroitement apparentés, l'un étant un mutant de l'autre, dépend donc de récepteurs entièrement distincts, dont la spécificité particulièrement stricte constitue un exemple frappant de la corrélation qui existe entre la présence ou l'absence du récepteur chez la bactérie et la sensibilité ou la résistance de celle-ci au phage.

Au cours d'expériences poursuivies en collaboration avec M. P. Beumer-Jochmans et dont nous ne possédons encore que des résultats préliminaires, nous avons soumis la souche de bacille dysentérique Flexner 6 à l'action du filtrat de culture de

TABLEAU VII.

GERME	SENSIBILITÉ		FIXATION SUR AB5	
	au phage PF1	au phage PF2	Phage PF1 p. 100	Phage PF2 p. 100
ϕ R normal	+	+	98	70
ϕ R/PF1	0	+	0	83,5
ϕ R/PF2	+	0	99	0

bacille lysogène de Lisbonne, qui contient plusieurs phages différents [6]. Nous avons constaté que l'on obtient de la sorte des mutants de Flexner 6 qui résistent à l'action de l'un ou l'autre des phages que contient ce filtrat lytique, en conservant leur sensibilité aux autres. Mais les résistants ainsi obtenus sont régulièrement lysogènes, libérant le phage à l'action lytique duquel ils résistent. Or les premiers résultats obtenus semblent indiquer que ces résistants lysogènes conservent le récepteur du phage auquel ils sont résistants, mais qu'ils libèrent en culture. Ces investigations sont particulièrement délicates et l'interprétation des résultats obtenus exige une grande prudence : il paraît néanmoins logique que le germe résistant lysogène, contrairement au résistant habituel, continue à élaborer le récepteur du phage, qu'il est capable de régénérer, bien qu'il ne soit pas lysé par lui comme la bactérie sensible.

Les exemples qui précèdent montrent donc qu'il existe une corrélation nette entre la présence du récepteur et la sensibilité de la bactérie au phage, et que la spécificité des récepteurs explique la spécificité d'action des phages. De même, la propriété que possèdent les récepteurs extraits des bactéries de fixer les phages correspondants constitue une preuve que c'est par l'intermédiaire de ces récepteurs, que les phages sont absorbés par les bactéries sur lesquelles ils agissent.

Diverses expériences, effectuées en mettant en œuvre des sérums antibactériens, viennent encore confirmer cette manière de voir [9]. On sait que Da Costa Cruz [10] avait reconnu que le sérum antibactérien spécifique protège la bactérie homologue contre la lyse par le bactériophage. Or, nous avons pu montrer que le sérum anti- ϕ R protège contre la lyse par le phage PF, non seulement le coli ϕ R mais encore le coli ϕ S et le bacille de Shiga, sensibles à l'action du même phage. Réciproquement le coli ϕ R est protégé contre le phage PF à la fois par les sérums anti- ϕ R, anti- ϕ S et anti-Shiga, ces trois sérums s'adressant à des germes sensibles tous trois au phage PF. Par contre,

φ S n'est protégé que par le sérum anti- φ S contre l'action du phage pfi, auquel il est seul sensible (tableau VIII). La protection d'un germe contre un phage attaquant plusieurs bactéries est assurée, non seulement par le sérum antibactérien homologue, mais encore par les sérums dirigés contre les autres bactéries sensibles à ce phage ; par contre, l'action d'un phage actif sur une seule souche n'est inhibée que par le sérum correspondant à cette souche. Tout se passe comme si le sérum antibactérien protégeait les différentes bactéries sensibles à un même phage, en bloquant chez elles un récepteur commun correspondant à ce phage et en empêchant ainsi le phage de s'y fixer.

TABLEAU VIII.

SÉRUMS	CONCENTRATIONS DE SÉRUM INHIBANT LA LYSÉ DE			
	φ S par PF	φ R par PF	Shiga par PF	φ S par pfi
Anti- φ S . .	0,2 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	5 p. 100
Anti φ R . .	5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	Pas d'inhibition par 30 p. 100.
Anti Shiga .	Pas d'inhibition par 30 p. 100	10 p. 100	5 p. 100	Pas d'inhibition par 30 p. 100.
SÉRUMS	PRÉCIPITATION DE L'EXTRAIT			
	EB de φ S	EB de φ R	B. de Shiga	EL de φ S
Anti φ S . .	++	++	++	++++
Anti φ R . .	+++	+++	++	0/±
Anti Shiga .	+	++	++	0

L'action des sérums antibactériens sur les récepteurs isolés des bactéries vient confirmer cette manière de voir : en effet, le sérum antibactérien rend le récepteur incapable de fixer le phage correspondant et inversement le récepteur prive spécifiquement le sérum antibactérien de son pouvoir protecteur vis-à-vis du phage, tout en lui laissant la capacité de protéger la bactérie contre d'autres phages. On constate, par exemple, que l'extrait EL de φ S, qui contient le récepteur propre à pfi, prive le sérum anti- φ S du pouvoir de protéger φ S contre pfi, mais non de la faculté de le protéger contre PF, alors que le récepteur de ce dernier phage, contenu dans l'extrait EB de φ S ou de φ R, prive le sérum anti- φ S du pouvoir de protéger φ S contre PF et non contre pfi (tableau IX).

TABLEAU IX.

	INHIBITION DE LA LYSÉ DE			
	φ S par PF	φ R par PF	Shiga par PF	φ S par pfi
Sérum anti φ S + extrait :				
EL de φ S	+			0
EB de φ S	0			+
EB de φ R	0			
B. de Shiga	+			
Sérum anti- φ R + extrait :				
EL de φ S		+		
EB de φ S		0		
EB de φ R		0		
B. de Shiga		+		
Sérum anti-Shiga + extrait :				
EL de φ S			+	
EB de φ S			+	
EB de φ R			+	
B. de Shiga			0	

L'examen des tableaux VIII et IX montre, toutefois, que les récepteurs bactériens sont doués d'une double spécificité, dont l'une est déterminée par le phage auquel ils correspondent et l'autre par la bactérie qui les élabore. On remarque, en effet, que si le sérum anti- φ S protège contre PF à la fois φ S, φ R et le bacille de Shiga, le sérum anti-Shiga, par contre, ne protège que φ R et le bacille de Shiga contre ce même phage; le coli φ S, bien que sensible comme le bacille de Shiga au phage PF, n'est cependant pas protégé contre ce phage par le sérum anti-Shiga. Le pouvoir précipitant du sérum anti-Shiga, vis-à-vis de l'extrait EB du coli φ S, est d'ailleurs nettement moins marqué que vis-à-vis de l'extrait de bacille de Shiga ou de coli φ R. On constate, en effet, une corrélation très nette entre le pouvoir précipitant des sérums vis-à-vis des extraits et leur pouvoir protecteur contre les phages que ces extraits sont susceptibles d'inhiber (tableau VIII), en d'autres termes, entre la capacité des sérums de s'unir aux récepteurs et leur pouvoir de protéger les bactéries contre les phages correspondant à ces récepteurs. Toutefois, la spécificité d'origine de ces derniers les empêche de réagir avec un sérum répondant à une espèce microbienne trop éloignée de celle dont ils proviennent.

S'il est exact que le phage se fixe sur le récepteur corres-

pendant de la bactérie qu'il attaque et que le sérum antibactérien protège cette bactérie en bloquant le récepteur du phage, on peut supposer qu'un sérum anti-récepteur doit se comporter comme le sérum antibactérien. C'est bien ce que l'on observe : l'injection au lapin du récepteur du phage PF (extrait AB5 du coli ϕ S) permet d'obtenir un immunsérum, qui comme le sérum anti- ϕ S protège le coli ϕ S contre le phage PF, mais qui, contrairement au sérum antibactérien, n'agglutine pas les bactéries (P. Bordet et J. Beumer [7]).

Bien que cet exposé soit plus spécialement consacré aux récepteurs des bactériophages, qu'il nous soit permis, en terminant, de faire une brève allusion aux colicines. En effet, les recherches de P. Bordet et celles que nous avons poursuivies en collaboration avec lui ont montré que la sensibilité des bactéries à l'action antibiotique des colicines dépend de la présence, chez les germes sensibles, d'un récepteur spécifique, qui fait défaut chez les germes résistants.

P. Bordet [41] avait constaté que le phage PF et la colicine FVN (produite par un mutant [VN] de la souche de coli V de Gratia) s'attaquent aux mêmes souches microbiennes et que les bactéries sensibles à la colicine sont protégées contre celle-ci par les sérums antibactériens correspondants, comme elles le sont par ces mêmes sérums contre l'action du phage PF. Il était logique, par conséquent, de se demander si la colicine, comme le phage, se fixe sur le germe sensible par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique. Nous réussîmes à préparer des extraits (AB5) de coli ϕ S, doués de la propriété de fixer le phage PF et la colicine FVN, isolant ainsi pour la première fois de la bactérie sensible une fraction contenant le récepteur d'une colicine, récepteur que nous avons pu purifier dans une certaine mesure, en le précipitant par l'acide trichloracétique à pH 5, sans toutefois parvenir à le séparer du récepteur du phage PF, dont il se distingue pourtant, comme nous allons le voir [7]. En effet, la préparation d'extraits semblables à partir du coli ϕ S devenu résistant, soit à la colicine (ϕ S/FVN), soit au phage (ϕ S/PF) montre que les germes résistants, qui se développent après action de la colicine sur la culture sensible, ont perdu le récepteur spécifique de la colicine, mais ont conservé celui du phage, auquel ils sont restés sensibles. On constate, de même, que les germes résistants à PF ne possèdent pas le récepteur de ce phage, mais sont encore pourvus de celui de la colicine, à laquelle ils sont demeurés sensibles (tableau VI).

Plus récemment, nous avons pu montrer (P. Bordet et J. Beumer [42]) que la sensibilité de la souche de coli ϕ S à deux colicines, qui bien qu'élaborées par des souches antibiotiques différentes se comportent comme si elles étaient identiques, leur spectre d'activité étant le même et la résistance acquise vis-à-vis

de l'une entraînant la résistance à l'autre, est liée à la présence d'un récepteur unique chez la bactérie réceptive. En effet, ces deux colicines sont neutralisées par le même extrait bactérien et celui que l'on prépare aux dépens des bactéries résistantes à l'une des colicines se montre incapable de neutraliser l'une et l'autre.

Ces recherches établissent donc que la sensibilité des bactéries aux colicines que nous avons étudiées, de même que la réceptivité aux phages, dépend de la présence de récepteurs appropriés. La spécificité de ceux-ci, dans le cas des colicines comme dans celui des phages, explique la spécificité d'action de l'antibiotique comme de l'agent lytique.

CONCLUSIONS.

L'existence, chez les bactéries sensibles aux phages, de récepteurs spécifiques de ceux-ci paraît bien constituer la raison de la spécificité d'action des bactériophages. La présence du récepteur approprié semble être la condition nécessaire de la sensibilité de la bactérie à un phage donné ; la résistance du germe semble, par ailleurs, dépendre dans la plupart des cas de son absence. Mais s'il est indispensable que le phage se fixe sur le récepteur bactérien pour pénétrer dans la bactérie, il s'en faut que cette condition nécessaire soit aussi suffisante. Le phage absorbé par la bactérie sensible doit pouvoir s'y multiplier et en être libéré au cours de la lyse : l'accomplissement intégral du cycle du phage exige le déroulement d'une chaîne de réactions, dont l'interruption en un point quelconque pourrait être la cause de la résistance du germe. Il est toutefois permis de remarquer que les cas, où des germes résistants à un phage sont néanmoins capables de le fixer, constituent des exceptions, et ceci confère à l'acte initial du phénomène bactériophagique une importance qu'on ne peut sous-estimer : il n'est pas impossible que la fixation sur le récepteur déclenche, du fait même, la suite des réactions, qui conduiront à la reproduction du phage.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1929, **32**, 15 et 349 ; *Ibid.*, 1930, **33**, 647.
- [2] P. LEVINE et A. W. FRISCH. *Proceed. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1932, **30**, 933 ; *Ibid.*, 1933, **31**, 46.
- [3] J. BEUMER. *Rev. Belge Path. Méd. expér.*, 1947, **18**, 244.
- [4] P. BORDET et J. BEUMER. *Schw. Zeitschr. Path. u. Bakt.*, 1942, **5**, 265.
- [5] P. BORDET. *Bull. Acad. Royale de Méd. de Belgique*, 1941, p. 258.

- [6] J. BEUMER et M. P. BEUMER-JOCHMANS. *Ces Annales*, 1952, **83**, 582.
- [7] P. BORDET et J. BEUMER. *Bull. Acad. Royale de Méd. de Belgique*, 1949, **44**, 116.
- [8] J. BEUMER et L. QUERSIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1161.
- [9] J. BEUMER. *Rev. Belge Path. Méd. expér.*, 1947, **18**, 289.
- [10] J. DA COSTA CRUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 840.
- [11] P. BORDET. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 257.
- [12] P. BORDET et J. BEUMER. *Rev. Belge Path. Méd. expér.*, 1951, **21**, 245.

ANTIGÈNES ENTRAVANT L'ACTION DE CERTAINS BACTÉRIOPHAGES

par PIERRE NICOLLE, ANDRÉ JUDE et GISÈLE DIVERNEAU.

(Institut Pasteur, Service des Bactériophages,
et Laboratoire central de Bactériologie de l'Armée.)

INTRODUCTION.

Parmi les facteurs probablement multiples qui conditionnent la sensibilité des bactéries aux bactériophages, certains antigènes jouent un rôle capital : les travaux de Marcus, 1926 [1] ; de Hadley [2] et de Burnet, 1927 [3], 1929 [4], 1934 [5], confirmés et complétés par de nombreux auteurs (1), ont établi qu'il existait fréquemment chez les Entérobactériacées une relation entre la sensibilité d'une bactérie, ou d'un groupe de bactéries, à un bactériophage donné, et la présence d'un certain antigène à la surface de cette bactérie, ou de toutes les cultures du groupe. Cet antigène est variable suivant les bactériophages. Il peut appartenir à l'une des différentes catégories connues : antigènes somatiques, antigènes flagellaires, antigènes d'enveloppe.

Un bactériophage, le phage IX par exemple, agit sur la forme smooth du bacille typhique et d'autres *Salmonella* du groupe D qui possèdent l'antigène somatique IX. Il est inactif sur la forme rough de *S. typhi* et sur les formes smooth et rough des *Salmonella* des groupes A, B, C, E, etc., qui sont dépourvues du facteur IX.

Un autre bactériophage, le phage Vi I de Craigie, lyse les formes Vi positives de *S. typhi*. Il est sans action au contraire

(1) Notamment : Levine et Frisch, 1932 [6], 1933 [7], 1934 [8] ; Cough et Burnet, 1934 [9] ; Rakietsen, Rakietsen et Doff, 1936 [10] ; Craigie et Brandon, 1936 [11] ; Sertic et Boulgakov, 1936 [12, 13] ; Scholtens, 1936 [14] ; Sertic, 1937 [15] ; Sertic et Boulgakov, 1937 [16] ; Scholtens, 1937 [17] ; Rakietsen et Rakietsen, 1937 [18] ; Pirie, 1940 [19] ; Beumer, 1940 [20] ; Rakietsen et Bornstein, 1941 [21] ; Rakietsen, 1942 [22] ; Felix et Callow, 1943 [23] ; Craigie et Felix, 1947 [24] ; Beumer, 1947 [25] ; Guelin, 1947 [26] ; Bordet et Beumer, 1948 [27] ; Beumer et Quersin, 1949 [28] ; Miller et Goebel, 1949 [29] ; Goebel, 1950 [30] ; Felix et Callow, 1951 [31] ; Nicolle, Rita et Huet, 1951 [32, 33] ; Jude et Nicolle, 1952 [34, 35] ; Nicolle et Jude, 1952 [36, 37] ; Jude, Nicolle, Servant et Servant, 1952 [38].

sur les formes Vi négatives du même bacille. Il lyse les formes Vi positives de *S. paratyphi* C, d'*Escherichia coli* Vi et de la souche *Ballerup*, et il respecte les formes Vi négatives de ces germes, ainsi que toutes les *Salmonella* ne possédant pas l'antigène Vi.

L'antigène qui détermine ainsi la sensibilité joue le rôle de « récepteur » spécifique du bactériophage à la surface du microbe. Il est le facteur cellulaire essentiel de la fixation des corpuscules bactériophages sur celui-ci.

Lorsque les corpuscules se trouvent en présence de leurs récepteurs spécifiques, et que les conditions de l'environnement sont favorables, ils s'unissent les uns aux autres en une combinaison relativement stable, mais non entièrement irréversible, dans laquelle, tant qu'ils demeurent unis, leur affinité mutuelle se trouve saturée. Ceci signifie que les corpuscules fixés ont perdu leur pouvoir de se lier à de nouveaux récepteurs et que les récepteurs bloqués ne peuvent plus fixer de corpuscules libres.

S'il s'agit de germes vivants et en état de se multiplier, à la suite de cette fixation, qui constitue la première et obligatoire étape du phénomène, tout le processus de la bactériophagie, pénétration, multiplication, lyse et libération des corpuscules nouvellement formés, se déroule généralement, mais non obligatoirement. Il y a des cas en effet où tout s'arrête au stade de la fixation. C'est également ce qui se produit, lorsque les germes sont morts ou en état de repos.

Dans les extraits bactériens obtenus par des procédés non brutaux (Bordet et Beumer, 1948 [27]), le récepteur, c'est-à-dire dans nos exemples, l'antigène déterminant la sensibilité, passé en solution sans subir de dénaturation, s'unit encore aux corpuscules bactériophages et, ce faisant, il les inactive. C'est une inactivation spécifique et, dans une certaine mesure, réversible.

L'effet inverse des antigènes, c'est-à-dire leur rôle dans la détermination, non plus de la sensibilité, mais de la résistance à certains bactériophages, bien qu'occasionnellement signalé à plusieurs reprises, n'a guère retenu l'attention jusqu'ici. Nous pensons qu'il intervient beaucoup plus souvent qu'on ne le croit et qu'il est une des causes fréquentes de ces apparents caprices de sensibilité que montrent tant d'espèces bactériennes voisines ou tant d'échantillons d'une même espèce.

Dans ce travail, nous citerons plusieurs exemples pour lesquels la résistance des bactéries à la lyse bactériophagique nous semble devoir être rapportée à la présence de certains antigènes. Nous consacrerons ensuite une étude plus approfondie de l'un de ces exemples, celui d'une souche d'*E. coli* Vi, qui nous permettra de développer plusieurs arguments en faveur de notre hypothèse. Enfin nous montrerons qu'un même antigène, en l'espèce l'anti-

gène Vi, peut se comporter, suivant les bactériophages utilisés, tantôt comme un facteur de sensibilité, tantôt comme un facteur de résistance.

I. — DIFFÉRENCES DE SENSIBILITÉ DES FORMES SMOOTH ET ROUGH D'UNE MÊME BACTÉRIE A UNE SÉRIE DE BACTÉRIOPHAGES.

Dans quelques cas particuliers, la résistance des bactéries à un bactériophage semble bien être due à la présence d'un certain antigène. Lorsque cet antigène manque, la bactérie devient sensible.

a) C'est ainsi que Burnet, 1930 [39], étudiant l'action de 40 phages environ sur les formes smooth et rough de *B. sanguinarum*, souche 398, observe que certains d'entre eux, les plus nombreux, agissent sur les deux formes. D'autres attaquent seulement la forme smooth. Enfin, un troisième groupe n'attaque que la forme rough. Dans ce dernier cas, on note donc l'apparition de la sensibilité, parallèlement à la variation S → R, chez une bactérie initialement résistante : « This suggests an uncovering (Bail's « Entdeckung ») of some surface element previously masked ». Le récepteur du phage actif sur la forme rough et inactif sur la forme smooth serait donc « masqué » par l'antigène ou les antigènes présents à la surface de cette dernière et absents chez la forme rough. Des schémas suggestifs accompagnent l'exposé de cette hypothèse.

b) De ces observations anciennes, nous pouvons rapprocher le fait suivant concernant le genre *Escherichia* :

La culture d'*E. coli* n° 270 de notre collection, isolée d'un cas de gastro-entérite infantile, se dissocie en deux types de colonies inégalement réparties :

1° Les plus nombreuses, lisses, bombées, parfaitement rondes, transparentes et moyennement irisées lorsqu'on les examine en transillumination oblique [40], fournissent des suspensions stables en eau physiologique. Leurs subcultures sont agglutinées à un taux élevé par l'antisérum 111 : B4. Il s'agit donc d'un germe appartenant au groupe sérologique 111 : B4. Si l'on fait agir sur une subculture de cette variante smooth une série de 25 bactériophages sélectionnés en vue de la lysotypie du groupe 111 : B4 [41], on constate que 5 d'entre eux seulement produisent un effet lytique. Mentionnons en passant que ces réactions sont celles du type Sèvres 3.

2° Quelques rares colonies plates, opaques, ternes, violacées et présentant des bords irréguliers, donnent en eau physiologique des suspensions instables. Les subcultures de ces colonies rough sont sensibles à 10 bactériophages. Ces réactions ne correspondent au schéma d'aucun des types actuellement individualisés.

Les figures 1 et 2 permettent de comparer aisément les spectres respectifs de sensibilité des formes smooth et rough de la souche *E. coli* n° 270.

D'après ces résultats, 3 éventualités se présentent :

1° Certains bactériophages (5, 6) agissent exclusivement sur la forme smooth. Nous ne sommes pas en mesure de dire si l'activité de ces bactériophages est en relation avec la présence, dans la variété smooth, des antigènes somatiques, flagellaires, ou d'enveloppe, s'il s'agit, par conséquent, de bactériophages « O », « H » ou « K ». Mais il est évident que cette activité est liée à la qualité

Variante S.

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10
11	12	13	14	15
16	17	18	19	20
21	22	23	24	25

FIG. 1.

Variante R.

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10
11	12	13	14	15
16	17	18	19	20
21	22	23	24	25

FIG. 2.

FIG. 1 et 2. — *E. coli* III : B₄ n° 270. (Type Sèvres 3.)

Gamme de sensibilité des variantes S et R à une série de 25 bactériophages. La variante S est sensible à 5 bactériophages (5, 6, 17, 18 et 20). La variante R est sensible à 10 bactériophages (1, 2, 3, 4, 9, 14, 17, 18, 20 et 21).

smooth, puisque la forme rough leur est réfractaire. Nous dirons provisoirement que ce sont des bactériophages « S ».

2° D'autres bactériophages (17, 18, 20) agissent sur les deux formes : ce sont des bactériophages « R », Felix, 1952 [42]. Les récepteurs bactériens de ces bactériophages sont probablement constitués par les polysaccharides R spécifiques de groupe, qui sont présents à la fois dans la forme rough et dans la forme smooth, ou bien peut-être par des récepteurs non antigéniques, comme Beumer en admet l'existence [43], qui seraient communs aux deux formes.

3° Enfin, une troisième catégorie de bactériophages (1, 2, 3, 4, 9, 14, 21) est active sur la forme rough et totalement dépourvue d'action sur la forme smooth.

D'après tout ce que l'on sait, le passage de la forme smooth à la forme rough s'accompagne d'un appauvrissement de l'équipement antigénique [perte des antigènes glucidolipidiques] (Boivin et Mesrobian [44]), jamais d'un enrichissement. On est en droit de se demander si l'acquisition, par la variante rough, de la sensibilité à certains bactériophages auxquels la variante smooth résiste, n'est pas due précisément à la disparition d'un ou de plusieurs antigènes présents dans la variante smooth. Autrement dit, la résistance de la variante smooth à ces bactériophages ne serait-elle pas déterminée par la présence d'un ou de plusieurs antigènes qui font défaut dans la variante rough ?

Notons en passant qu'il ne faut pas attribuer une signification particulière au fait que la variante rough, dans l'exemple que nous venons de citer, se montre sensible à un nombre de bactériophages plus grand que la variante smooth. Cet apparent élargissement du spectre de sensibilité tient exclusivement au choix des bactériophages utilisés dans l'expérience que nous avons relatée. Avec d'autres séries de bactériophages, on verrait sans doute se produire parfois un renversement des proportions respectives des phages actifs.

Il faut donc se garder de conclure à une augmentation générale de la sensibilité aux bactériophages par le passage de la forme smooth à la forme rough. Les spectres de sensibilité des deux formes sont seulement différents et la forme rough, qui est antigéniquement dépouillée, est sensible parfois à des bactériophages auxquels la forme smooth, qui est complète sous ce même rapport, se montre réfractaire.

Nous avons eu l'occasion d'observer de nombreux faits analogues, concernant non seulement d'autres *Escherichia coli*, mais aussi plusieurs *Salmonella*, en particulier *S. paratyphi* B. Il ne nous paraît pas utile de citer d'autres exemples.

II. — RÉSISTANCE A L'ÉGARD DE CERTAINS BACTÉRIOPHAGES, CONFÉRÉE AUX BACTÉRIES SENSIBLES, PAR LEUR TRANSFORMATION MUQUEUSE.

Kimura, 1925 [45], a constaté que les variantes muqueuses de certaines bactéries sensibles à un bactériophage étaient souvent résistantes à celui-ci. Il a supposé que le mucus exerçait, dans ces cas, une simple protection physico-chimique analogue à celle qu'on attribue généralement à la gélatine. De ce fait, il convient de rapprocher l'observation donnée récemment par E. W. McCloy, 1951 [46] concernant la résistance de *B. anthracis* dans sa forme R muqueuse à un bactériophage qui agit fortement sur la forme R normale :

« Strains of *B. anthracis*, which in their normally rough state

were strongly attacked by the phage, were not perceptibly attacked when they were in the mucoid state, that is when they grown on 20 p. 100 serum agar in an atmosphere of high CO_2 content, unless the inoculum was very thin. It would seem, therefore, that capsulation protects an organism from attack by the phage. A proportion of the organism in a culture may be attacked, but the amount of mucoid material formed by the others may be sufficient to mask the lysis of this proportion ».

Ici encore, la forme R normale est donc protégée par la substance muqueuse (2).

III. — DIFFÉRENCES DE SENSIBILITÉ AUX BACTÉRIOPHAGES, PRÉSENTÉES PAR DES CULTURES D'UNE MÊME BACTÉRIE, INCUBÉES A DES TEMPÉRATURES VARIÉES.

Plusieurs auteurs, notamment Felix, Bhatnagar et Pitt, 1934 [47], P. Bordet, 1942 [48], Jude et Nicolle, 1952 [34, 35], Nicolle et Jude, 1952 [36, 37], ont signalé que la constitution antigénique de certaines entérobactériacées pouvait varier considérablement avec la température d'incubation des cultures. De telles modifications entraînent, comme on est en droit de l'attendre, des différences spectaculaires dans la sensibilité de ces cultures à certains bactériophages.

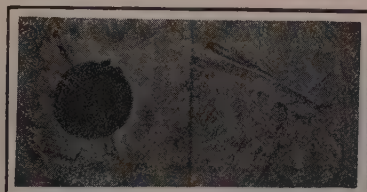
a) C'est ainsi qu'une culture d'une souche Vi positive de *S. typhi*, incubée à 37°, est riche en antigène Vi, et par conséquent très sensible aux phages Vi (fig. 4), alors que la même souche, cultivée à 18° ou à 41°5, ne contient que très peu de ce facteur et est à peu près totalement réfractaire aux phages Vi (fig. 3 et 5). Dans les 3 cas, au contraire, les antigènes O étant présents, un phage « O » est constamment actif (fig. 3, 4 et 5, place b).

b) Certaines observations concernant l'espèce *S. paratyphi* B nous paraissent devoir être rapprochées de ces faits.

Pratiquons par exemple la lysotypie d'une souche *S. paratyphi* B (n° 52807) par la méthode de Felix et Callow [23] en ajoutant aux phages de ces auteurs quelques phages complémentaires, en particulier le phage Bordet. La culture estensemencée sur 3 boîtes. La première est laissée à 18°, la seconde est incubée

(2) Avec L. Le Minor et Cl. Gerbeaux, l'un de nous (N) a constaté récemment qu'un bacille paratyphique B muqueux, isolé du liquide céphalo-rachidien d'un enfant, était résistant à tous les bactériophages de la lysotypie par la méthode de Felix et Callow. Une colonie non muqueuse de la même culture ainsi qu'une culture non muqueuse obtenue directement par coproculture du même malade, réagissaient aux phages de la lysotypie suivant le schéma du type Taunton.

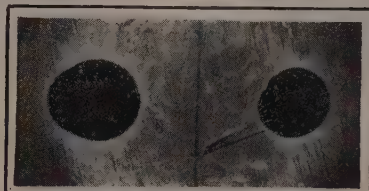
S.typhi Vi+ cultivé à 18°



a b

Fig. 3

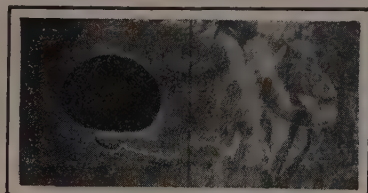
S.typhi Vi+ cultivé à 37°



a b

Fig. 4

S.typhi Vi+ cultivé à 41°



a b

Fig. 5

FIG. 3, 4 et 5. — *S. typhi*, souche Vi positive, cultivée à 18°, 37° et 41° 5. A 18°, il ne se forme pas d'antigène Vi ; à 37°, l'antigène Vi est élaboré en abondance ; à 41° 5, la culture n'en possède qu'une très faible quantité. En a, phage anti-0. Ce phage est actif aux 3 températures d'incubation. La présence de l'antigène Vi ne lui est pas nécessaire. En b, phage₄Vi. Ce phage n'agit qu'à 37°. L'antigène Vi est indispensable à son action.

à 37° et la troisième à 41°5. Après vingt-quatre heures, on effectue la lecture. Les résultats obtenus avec la boîte incubée à 37° nous

18°

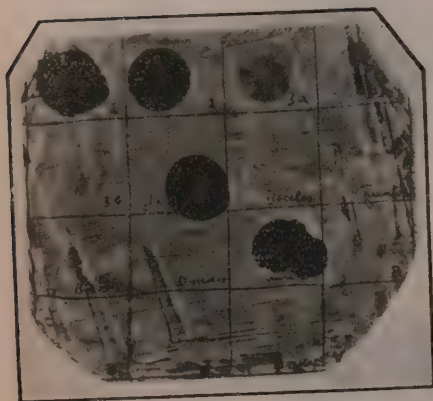


FIG. 6.

37°

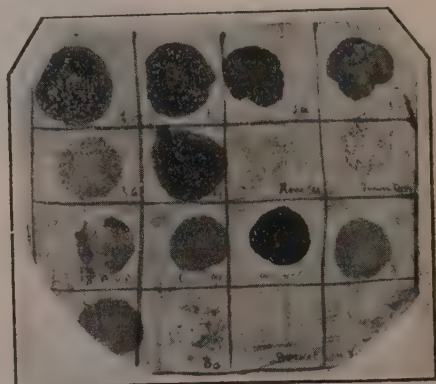


FIG. 7

41°

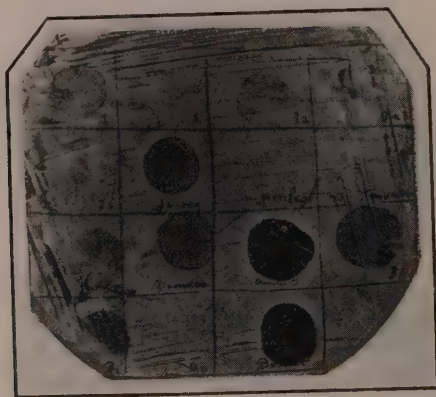


FIG. 8.

FIG. 6, 7 et 8. — Lysotypie de la souche de *S. paratyphi* B, n° 52807, type 1, var. 2, à 3 températures d'incubation différentes. De gauche à droite et de haut en bas : phages 1, 2, 3a, 3a1, 3b, Jersey, Beccles, Taunton, BAOR, Dundee, anti "O", B₁, B₂, B₀ Bordet et mélange Vi. Voir au tableau 1 et dans le texte, l'interprétation des résultats.

montrent que la souche 52807 appartient au type 1, var. 2, de l'espèce *S. paratyphi* B [lyse confluite sous l'action de tous les

phages B Vi à l'exception des phages Beccles et Taunton, qui donnent des réactions moins complètes] (tableau I et fig. 6, 7 et 8).

TABLEAU I. — *Lysotypie des cultures de S. paratyphi B n° 52807, type 1, var. 2, incubées à trois températures différentes.*

Incubation à	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	1	2	3a	3aI	3b	Jersey	Beccles	Taunton	BAOR	Dundee	anti "O"	B ₁	B ₂	B ₀	Bordet	Vi
18°	LC	LC	lp	lp	—	LC	—	—	—	—	LC	—	—	—	—	—
37°	LC	LC	LC	LC	LCv	LC	++	+++	LCv	LCv	LC	LCv	LCv	++	+	—
41°5	++	+	lp	—	—	LC	—	—	lp	LCv	LC	LCv	LCv	—	LC	—
	2°	2°	2°	2°		2°										

☞ Légende : LC, lyse confluite; LC 2°, lyse confluite avec colonies secondaires; LCv, lyse confluite avec culture secondaire en nappe continue; lp, lyse partielle; +, ++, +++, nombre croissant de plages.

Si nous comparons maintenant entre eux les résultats obtenus aux différentes températures, nous constatons 3 éventualités :

1° Certains phages agissent sensiblement de la même façon à 18°, à 37° ou à 41°5. C'est le cas notamment du phage « O » (fig. 6, 7 et 8, place 11, et fig. 9, 10 et 11, place c). Cela signifie sans doute que l'antigène qui commande la sensibilité (antigène O) est élaboré en quantités suffisantes, indifféremment à ces 3 températures. Ces faits sont à rapprocher de ceux que nous avons signalés pour le bacille typhique dans le paragraphe précédent (III, a).

2° D'autres phages agissent plus ou moins complètement à 37°, mais ils sont dépourvus d'effet à 18° et à 41°5. C'est le cas des phages 3 b, Beccles et Taunton (fig. 6, 7 et 8, places 5, 7 et 8, et fig. 9 et 11, place a). Ou bien ils agissent à 18°, mais non à 41°5 [phages 2, 3 a, 3 a I] (fig. 6, 7 et 8, places 2, 3 et 4), ou encore à 41°5, mais non à 18° [phage Dundee] (fig. 6, 7 et 8, place 10).

On est en droit de se demander si ces différences dans la sensibilité aux bactériophages que l'on observe chez des cultures incubées à ces 3 températures ne correspondent pas, là encore, à des variations de l'équipement antigénique. Les recherches que nous avons entreprises nous permettront sans doute de répondre prochainement à cette question.

3° Enfin, un bactériophage, le phage Bordet, est beaucoup plus actif à 41°5 qu'à 37° et à 18° (fig. 6, 7 et 8, place 15, et fig. 9, 10

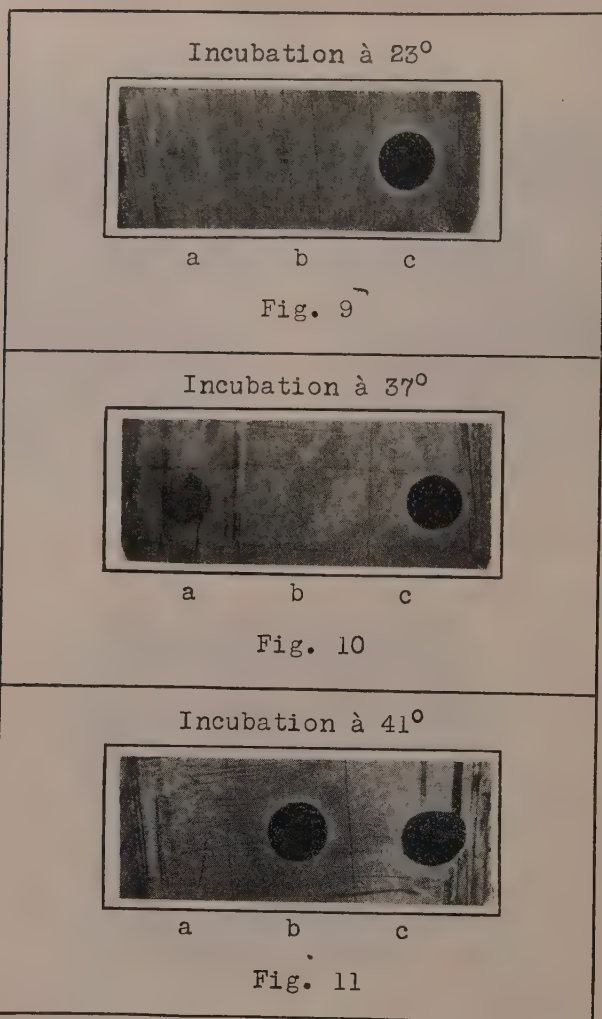


FIG. 9, 10 et 11. — *S. paratyphi* B n° 52807, type 1, var. 2, à 3 températures d'incubation différentes (23°, 37° et 41° 5). *a*, phage 3*b*, actif seulement sur la culture incubée à 37°; *b*, phage Bordet, pleinement actif sur la culture incubée à 41° 5 et presque dépourvu d'action sur les cultures développées à 23° et 41° 5; *c*, phage anti "O", actif sur les cultures développées aux 3 températures.

et 11, place b). A ces deux températures, il forme seulement quelques plages, tandis qu'à 41°5, il donne une lyse totale sans colonies secondaires.

Dans ce cas, on peut supposer qu'un certain antigène, présent dans les cultures à 18° et à 37°, exerce une action protectrice vis-à-vis du bactériophage Bordet et qu'à 41°5, cet antigène n'étant pas élaboré, la culture devient sensible au phage.

Ce serait là un phénomène analogue au « démasquage » de la sensibilité au cours de la variation $S \rightarrow R$, dont il a été question dans le paragraphe I.

IV. — DIFFÉRENCE DE SENSIBILITÉ AUX BACTÉRIOPHAGES CHEZ LES VARIANTES D'*E. coli* POURVUES OU DÉPOURVUES D'ANTIGÈNES CAPSULAIRES.

Kauffmann et Vahlne, 1945 [49], ont signalé l'existence de bactériophages spécifiques des souches d'*E. coli* pourvues d'antigènes capsulaires (formes A plus et L plus). Incidemment, ils ont mentionné la résistance de ces souches A plus et L plus à certains bactériophages non capsulaires : « It was found by these workers (K et V) that strains with A antigens are resistant to the general phages which attack non-capsulated strains. This was also true for the strains with L antigens, but the difference in the activity of the phage against an L plus and an L minus form was not so clear », Kauffmann, 1951 [50].

En présence de ces faits, les auteurs précités admettent comme évidente une relation entre la présence d'un antigène d'enveloppe (antigène A ou antigène L), chez une souche d'*E. coli*, et l'état de résistance de cette souche à des bactériophages qui, par ailleurs, agissent sur les formes dépourvues de ces antigènes. Ils rapprochent cet empêchement de la lyse bactériophagique par la présence des antigènes capsulaires de l'inagglutinabilité O des mêmes germes, pour laquelle ils avaient énoncé la même explication.

Cependant, à notre avis, le rôle empêchant de certains antigènes ne saurait être admis définitivement avant que la démonstration expérimentale n'en soit apportée. C'est à cette tâche que nous avons consacré nos efforts.

V. — EXPÉRIENCES AVEC *E. coli* Vi.

1° LA CULTURE 2624/36. — L'antigène Vi, on le sait, confère au bacille typhique l'une de ses plus intéressantes caractéristiques. Plus de 99 p. 100 des bacilles à leur isolement de l'organisme sont capables de l'élaborer.

Mais cet antigène n'est pas l'apanage exclusif de l'espèce

S. typhi. On l'a retrouvé, — on a retrouvé du moins un antigène sérologiquement analogue à l'antigène Vi du bacille typhique — chez une autre *Salmonella* humaine, *S. paratyphi* C, et aussi chez des germes dont le pouvoir pathogène pour l'homme n'a pas été jusqu'ici entièrement prouvé. Kauffmann, 1941 [51, 52], se basant sur cette communauté antigénique, avait proposé de classer dans le genre *Salmonella* tout bacille capable d'élaborer le facteur en question. C'est ainsi qu'il créa les espèces *S. ballerup*, *S. hormacchei*, *S. coli* I. Par la suite, cette tentative de classification sérologique fut abandonnée et *S. ballerup* et *S. hormacchei* furent rangées, d'après leurs caractères biochimiques, dans le groupe indépendant *Ballerup-Bethesda*, intermédiaire entre les *Salmonella* et les *Escherichia* et *S. coli* I fut incorporée à l'espèce *Escherichia coli* [50].

Nous avons eu à notre disposition deux échantillons Vi de cette dernière espèce (3), la culture 2624/36 et la culture 5396/36. Les expériences ci-après ont été exclusivement faites avec la culture 2624/36. La culture 5396/38 se comporte en effet d'une manière sensiblement différente et ne convient pas pour cette recherche.

2° L'ANTIGÈNE Vi d'*E. coli* Vi 2624/36. — Comme Kauffmann l'avait constaté [51, 52], l'antigène Vi de la culture *E. coli* Vi 2624/36 est sérologiquement identique à celui de *S. typhi*. Ceci signifie que cette souche est agglutinée par le sérum d'un lapin qui a reçu des injections de suspensions vivantes de bacille typhique, et qu'inversement, le sérum d'un lapin qui a reçu une suspension de la souche *E. coli* Vi agglutine le bacille typhique dans sa forme Vi positive et n'agglutine pas sa forme Vi négative. D'autre part, une suspension de la souche *E. coli* Vi absorbe les agglutinines Vi d'un sérum anti-Vi préparé par injection du bacille typhique au lapin, et inversement, une suspension du bacille typhique Vi positif absorbe les agglutinines Vi d'un sérum préparé par injection d'une suspension de la souche *E. coli* Vi 2624/36 au lapin.

Nos expériences d'absorption des agglutinines [34, 35, 36 37] nous ont montré également que la teneur en antigène Vi d'une culture Vi positive d'*E. coli* 2624/36 est très supérieure à celle d'une culture Vi positive du bacille typhique. Lorsque chacun de ces deux germes est placé dans les meilleures conditions d'incubation pour l'élaboration de ce facteur antigénique (18° pour *E. coli* 2624/36 et 37° pour *S. typhi*), la quantité élaborée par *E. coli* 2624/36 est environ vingt fois plus grande.

(3) Nous adressons nos remerciements au Dr Kauffmann pour l'envoi de ces souches.

3° ANALOGIE PHYSIOLOGIQUE ENTRE L'ANTIGÈNE Vi DE LA CULTURE 2624/36 ET L'ANTIGÈNE Vi TYPHIQUE. — L'antigène Vi d'*E. coli* 2624/36 est capable de fixer spécifiquement les phages Vi typhiques (phages Vi I, II, III et IV) et même il confère à cette souche une sensibilité totale ou partielle à ces phages, Nicolle, Rita et Huet, 1951 [32, 33] : sur gélose, avec les phages Vi concentrés, il se forme des placards lysés et avec les dilutions convenables, des plages séparées. En milieu liquide, la lyse est quelquefois assez délicate à saisir, en raison de l'apparition précoce d'une culture secondaire, mais les titrages opérés au début et à la fin de l'expérience mettent en évidence une multiplication importante du nombre des corpuscules bactériophages.

L'analogie sérologique de l'antigène Vi d'*E. coli* 2624/36 avec l'antigène Vi typhique se double donc d'une étroite analogie physiologique, puisque la présence de ces antigènes, seuls facteurs antigéniques communs entre les deux germes, permet le développement du processus bactériophagique complet : la fixation des corpuscules, leur multiplication et la lyse des éléments bactériens Vi positifs.

4° DISSOCIATION Vi POSITIVE → Vi NÉGATIVE DE LA SOUCHE 2624/36.

— Nous venons de dire que la souche 2624/36 montrait une sensibilité totale ou partielle à l'égard des bactériophages Vi. Ceci signifie que, dans certains cas, la lyse, aussi bien en milieu liquide que sur milieu solide, est à peu près complète ; le milieu redevient presque aussi limpide qu'avant l'ensemencement, et la gélose, à l'endroit où le phage a été déposé, se présente à l'état dénudé, avec seulement quelques rares colonies secondaires. Dans d'autres cas, au contraire, la lyse en milieu liquide est difficile à saisir et sur milieu solide, le placard lysé est masqué par une nappe bactérienne continue plus ou moins épaisse. L'action du phage est parfois même si discrète qu'elle passerait facilement inaperçue. Cependant, une lyse, même très partielle, peut être décelée grâce au procédé de la transillumination oblique [40]. La couche bactérienne, ayant subi l'action des phages Vi, prend une teinte bleuâtre qui tranche sur l'irisation intense et la vive luminosité de la culture non touchée par le phage.

A quoi tient cette irrégularité d'action des bactériophages Vi ? L'explication est simple : la souche 2624/36 se dissocie très rapidement, à un taux élevé, en éléments Vi positifs et éléments Vi négatifs.

Préparons, à partir d'une culture de vingt-quatre heures de la souche 2624/36 sur gélose, une suspension assez dense en bouillon. Puis opérons de cette suspension une série décimale de dilutions. Etalons sur une plaque de gélose quelques gouttes de la dilution 10^{-5} , par exemple. Plaçons cette plaque à 37°. Après

une incubation de vingt-quatre heures, nous constaterons qu'il s'est formé 300 à 400 colonies. En examinant la plaque de gélose par transparence, on distingue parmi elles deux types bien tranchés : des colonies opaques, presque noires, et des colonies transparentes. Grâce à l'artifice de la transillumination oblique [40], les colonies opaques apparaissent brillantes et très irisées, tandis que les colonies transparentes présentent un aspect peu lumineux, terne, bleuâtre. Les colonies irisées sont formées presque exclusivement de germes Vi positifs, c'est-à-dire donnant les réactions sérologiques directes de l'antigène Vi (agglutination par un sérum anti-Vi typhique) et indirectes (absorption des agglutinines Vi d'un sérum anti-Vi typhique). Nous les désignerons désormais sous le nom de colonies Vi plus. Les colonies non irisées comprennent, au contraire, une immense proportion d'éléments Vi négatifs et une proportion extrêmement faible (moins de 0,1 p. 100) d'éléments Vi positifs. Nous les appellerons colonies Vi moins.

Entre ces deux formes Vi plus et Vi moins, il existe une forme intermédiaire Vi plus — moins : certaines colonies non irisées présentent en effet une ou plusieurs taches irisées de structure radiée et généralement centrale. Ce sont très vraisemblablement des colonies Vi plus qui, au cours du développement, ont été affectées par une abondante variation Vi plus → Vi moins.

L'irisation, chez ces colonies, va donc de pair avec la présence de l'antigène Vi. Nous avons vu (Nicolle, Jude et Le Minor, *loc. cit.*) que l'irisation des cultures du bacille typhique était liée également à la présence du même antigène. On retrouve donc, pour la souche 2624/36, comme également pour la souche 5396/38 et la souche *Ballerup*, un parallélisme complet entre l'irisation et les caractères Vi positifs : l'agglutination Vi, l'absorption des agglutinines et, nous le verrons plus loin, la sensibilité aux phages Vi.

Si l'on repique une colonie irisée, c'est-à-dire une colonie Vi plus, sur gélose et qu'on pratique un nouvel isolement de colonies, on constate que la proportion de colonies irisées a diminué considérablement. C'est ainsi qu'après un seul repiquage à 37° (tableau II, colonnes 3 et 4) d'une suspension contenant 96 p. 100 d'éléments Vi plus, la proportion des colonies Vi plus est tombée à 41 p. 100. Après les troisième et cinquième repiquages à 37°, elle n'est plus que de 0.7 et 0.26 p. 100.

Cependant, même après un très grand nombre de repiquages les colonies irisées ne disparaissent jamais entièrement.

Notons en passant qu'à partir d'une colonie non irisée, on obtiendra toujours quelques très rares colonies irisées.

Jusqu'à présent, quel que soit le procédé employé : repiquages multiples, incubation à 41°5 (voir plus loin), traitement par les

TABLEAU II. — Dissociation d'une culture Vi plus d'*E. coli* 2624/36 en colonies Vi plus et colonies Vi moins au cours de trois séries de repiquages quotidiens à différentes températures.

La culture initiale avait fourni en quarante-huit heures sur plaque de gélose placée à 18°, 418 colonies Vi plus (96 p. 100) contre 17 colonies Vi moins (4 p. 100).

		REPIQUAGES QUOTIDIENS SUR GÉLOSE INCLINÉE A :					
		18°		37°		41°5	
		1 Colonies Vi +	2 Colonies Vi —	3 Colonies Vi +	4 Colonies Vi —	5 Colonies Vi +	6 Colonies Vi —
1 ^{er} repiquage . .	Nombres . .	572	107	219	315	0	243
	p. 100. . .	84,3	15,7	41	59	0	100
3 ^e repiquage . .	Nombres . .	307	117	3	382	0	115
	p. 100. . .	72,4	27,6	0,7	99,3	0	100
5 ^e repiquage . .	Nombres . .	321	374	1	395	0	164
	p. 100. . .	46,1	53,9	0,26	99,74	0	100

phages Vi, etc., nous n'avons jamais pu faire perdre complètement et définitivement à une culture de la souche 2624/36 sa faculté de fournir des colonies irisées. Tout se passe comme si, dans les conditions normales de culture (repiquages en série, incubations à 37°), la proportion d'éléments Vi plus et d'éléments Vi moins tendait vers un état d'équilibre aux environs de 0,5 p. 100 grâce à une certaine réversibilité de la dissociation Vi plus → Vi moins.

La dissociation Vi plus → Vi moins est beaucoup moins

 TABLEAU III. — Influence de la température d'incubation sur la vitesse de dissociation en colonies Vi plus et Vi moins d'une même suspension d'*E. coli* 2624/36, faite à partir d'une colonie Vi plus développée à 18°.

		PLAQUES DE GÉLOSE ENSEMENCÉES SIMULTANÉMENT avec la même suspension, puis placées à :					
		18°		37°		41°5	
		1 Colonies Vi +	2 Colonies Vi —	3 Colonies Vi +	4 Colonies Vi —	5 Colonies Vi +	6 Colonies Vi —
Nombres	418	17	282	107	0	257	
p. 100	96	4	72,4	27,6	0	100	

rapide si les cultures se développent à 18° (tableau II, colonnes 2 et 3). Au cinquième repiquage à cette température, la proportion de colonies Vi plus est encore voisine de 50 p. 100.

Au contraire, après l'incubation à 41° 5, dès le premier repiquage, il n'y a plus de colonies irisées. Notons toutefois qu'il ne semble pas s'agir ici d'une sélection par la chaleur de la variante Vi moins, car la même suspension de la culture 2624/36, qui sur une plaque incubée à 18° avait fourni 418 colonies Vi plus et 17 colonies Vi moins, a donné naissance par incubation à 41° 5 à 257 colonies Vi moins (tableau III). Bien que le nombre des colonies non irisées obtenues à 41° 5 soit sensiblement inférieur au total des colonies irisées et non irisées développées à 18° et à 37°, il est permis d'admettre que les 257 colonies Vi moins ont été formées par des germes qui, s'ils s'étaient multipliés à 18°, auraient fourni à peu près exclusivement des colonies Vi plus. L'incubation à 41° 5 empêche donc les germes potentiellement Vi d'élaborer l'antigène Vi.

5° ACTION DES PHAGES Vi SUR LES SUBCULTURES DES COLONIES Vi PLUS ET Vi MOINS. — En bonne logique, la lyse par les phages Vi devrait être d'autant plus intense que la culture employée est plus riche en éléments Vi. Ceci ne se confirme qu'en partie. Si l'on utilise pour ensemercer la plaque de gélose, qui doit servir à l'épreuve des phages, une suspension bactérienne préparée directement à partir de colonies Vi plus et qu'on mette la plaque à 37°, on obtient une lyse très visible, mais non totale : sur le fond fortement irisé et lumineux se détache un placard lysé parfaitement net, bien que toute sa surface soit comblée par une couche continue de culture secondaire terne et bleuâtre. Cette couche est formée par la prolifération des éléments Vi moins qui ont pris naissance et qui atteignent, dans les conditions indiquées, environ la moitié du nombre des germes.

Mais si au lieu d'incuber la plaque à 37° on la laisse à 18°, la dissociation Vi plus \rightarrow Vi moins étant très faible, il n'y aura pas de couche continue terne et bleuâtre. Mais au lieu d'avoir une lyse totale, comme on serait en droit de s'y attendre, on n'obtient qu'une lyse partielle. Le placard lysé est en partie comblé par une culture fortement irisée, donc Vi plus. La seule explication que nous puissions donner de ce fait paradoxal est celle-ci. L'action des phages Vi est ici entravée par l'excès de l'antigène Vi [26, 29]. On sait que l'antigène Vi est doué d'un pouvoir intense d'inactivation spécifique à l'égard des phages Vi. S'il y a excès d'antigène, une partie des phages Vi se trouve probablement inactivée dès son entrée en contact avec le germe. Nous sommes sans doute en présence, là encore, d'un cas d'inhibition de l'action bactériophagique par un antigène. Ce qui

est curieux ici, c'est que l'antigène empêchant l'action des phages n'est autre que l'antigène qui détermine la sensibilité à ces mêmes phages. C'est l'antigène spécifique du phage. Lorsqu'il est en excès, il se comporte comme un agent d'inhibition.

Lorsqu'on fait agir les phages Vi sur une plaque ensemencée avec une suspension préparée directement à partir de colonies Vi moins, il n'y aura aucune action lytique. Ceci se comprend puisque la culture en question ne contient qu'une proportion insignifiante d'éléments Vi plus.

6° INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE D'INCUBATION SUR L'ACTION DES PHAGES Vi. — Nous avons vu ce qui se passe lorsque les cultures sont incubées à 37°. A 18°, les phages Vi agissent sur les subcultures des colonies Vi plus; il ne se forme pas de culture secondaire composée d'éléments Vi moins, mais la lyse n'est plus complète. Elle laisse intacts de nombreux éléments Vi plus. Nous avons supposé que ce résultat paradoxal était dû à l'excès même de l'antigène Vi qui inactivait une proportion importante de corpuscules bactériophages avant que ceux-ci n'aient eu la possibilité d'agir. A la même température, les phages Vi sont sans action bien entendu sur les subcultures des colonies Vi moins. A 41°5, nous l'avons vu, l'antigène Vi ne se forme presque plus. Comme on devait s'y attendre, les phages Vi sont dénués d'action aussi bien sur les subcultures des colonies Vi plus incubées à cette température, que sur celles des colonies Vi moins qui se développent à 18°, à 37° ou à 41°5.

7° ACTION DU PHAGE CNV. — Nous avons isolé d'un mélange commercial de coliphages, destiné à la thérapeutique, un bactériophage, le phage CNV (phage coli non Vi) qui se comporte d'une manière opposée à celle des phages Vi : il est sans action sur la forme Vi plus d'*E. coli* 2624/36, obtenue par ensemencement direct à 18° à partir de colonies Vi plus. Il agit au contraire en donnant une lyse totale sur la forme Vi moins développée par incubation à 18°, à 37° et à 41°5 d'une subculture de colonies Vi moins ou par incubation à 41°5 d'une subculture de colonies Vi plus.

Lorsqu'il est mis en présence d'une culture Vi plus-moins (repiquages en série de colonies Vi plus et incubation à 18°, ou subcultures directes de colonies Vi plus et incubation à 37°) il donne, comme les phages Vi, une lyse incomplète, qui est d'autant plus nette que la culture a subi une dissociation « Vi plus → Vi moins » plus marquée. Mais à l'inverse de ce qu'on observe avec les phages Vi, la zone lysée est recouverte d'une couche continue de culture secondaire beaucoup plus irisée que la couche bactérienne intacte qui l'environne. Ceci est facile

à comprendre : la culture secondaire très irisée est formée exclusivement d'éléments Vi plus qui, comme nous l'avons vu, sont réfractaires au phage CNV, les éléments Vi moins ayant disparu sous l'action du phage, tandis que la couche bactérienne environnante est composée d'éléments Vi plus mélangés à une certaine proportion d'éléments Vi moins, d'où son irisation d'intensité moyenne.

8° LE PHAGE CNV EMPLOYÉ COMME PHAGE RÉVÉLATEUR DES ACTIONS LYTIQUES MASQUÉES DES PHAGES Vi. — De ce que nous venons de dire, il résulte donc que, si l'on fait agir les phages Vi sur une culture Vi plus-moins, les éléments Vi seront lysés. Les éléments non Vi se développeront seuls. Au contraire, si l'on fait agir le phage CNV, les éléments Vi plus seront conservés et les éléments Vi moins disparaîtront.

Dès lors, on peut prévoir que si l'on fait agir les deux phages sur une culture contenant un mélange d'éléments Vi plus et d'éléments Vi moins, toute la culture, à part quelques mutants résistants Vi plus et Vi moins, sera lysée. C'est en effet ce qui se produit.

L'un de nous a relaté ailleurs avec Rita et Huet [32, 33] que lorsque la proportion d'éléments Vi plus est très faible (par exemple inférieure à 2 p. 100) et que, de ce fait, la lyse par les phages Vi est pratiquement invisible, on peut utiliser le phage CNV comme phage révélateur de ces actions lytiques masquées.

De même, lorsque la proportion des éléments non Vi est très faible, un phage Vi peut jouer le même rôle révélateur pour mettre en évidence l'action lytique masquée du phage CNV.

9° PERTE DE L'ÉTAT RÉFRACTAIRE AU PHAGE CNV PAR INCUBATION À 41°5 D'UNE CULTURE Vi PLUS D'*E. coli* 2624/36. — La variante Vi plus de la souche 2624/36 est donc réfractaire au phage CNV et la variante Vi moins du même germe est au contraire sensible à ce phage. Il peut sembler évident *a priori*, comme Kauffmann et Vahlne [36] l'avaient admis pour les *E. coli* possédant des antigènes capsulaires, que l'antigène Vi se comporte ici comme un facteur de protection : la culture 2624/36, aussi bien dans sa forme Vi plus que dans sa forme Vi moins, posséderait le ou les récepteurs spécifiques (de nature antigénique ou non antigénique) du phage CNV. Dans la forme Vi plus, l'antigène Vi, antigène d'enveloppe, empêcherait l'accès des récepteurs aux corpuscules bactériophages, tandis que dans la forme Vi moins, l'antigène Vi étant absent, les récepteurs se trouveraient démasqués. Nous nous trouverions donc ici encore dans un cas analogue à celui que nous avons signalé, à propos des variantes rough, de démasquage de la sensibilité par la perte d'un antigène (paragraphe I).

Cependant, on pouvait se demander si la variante Vi plus ne différait pas de la variante Vi moins, outre l'absence de l'antigène Vi, par quelque autre caractère ayant la propriété de rendre les bacilles résistants au bactériophage CNV.

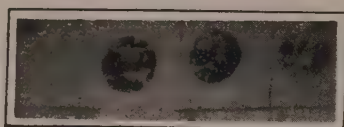
Pour écarter cette objection, nous avons mis à profit le fait que l'antigène Vi n'est pas élaboré lorsque le germe est cultivé à 41°5, même si on utilise pour l'ensemencement des plaques de gélose une suspension préparée directement à partir de colonies Vi plus qui à 18° fournissent plus de 94 p. 100 de colonies Vi plus. Plusieurs colonies Vi plus, développées sur plaque de gélose à 18° en quarante-huit heures, sont prélevées avec l'anse de platine et mises en suspension dans du bouillon. Avec cette suspension (IV gouttes), on ensemence trois plaques de gélose par étalement sur toute la surface. Aussitôt après, on dépose à distance les unes des autres, 1 goutte du phage CNV et 1 goutte de trois phages Vi de Craigie. Une des plaques est laissée à 18° et les deux autres sont incubées à 37° et à 41°5.

Après vingt-quatre heures, on constate que le phage CNV n'a aucun effet lytique visible dans la couche bactérienne très fortement irisée qui s'est développée à 18° (fig. 12, place *a*), tandis que les phages Vi ont donné une lyse très nette, bien que comblée partiellement par une couche irisée (fig. 12, places *b*, *c* et *d*). Sur la plaque incubée à 41°5, au contraire, le phage CNV a formé un placard complètement lysé dans la couche bactérienne non irisée (absence de l'antigène Vi) qui s'est formée (fig. 14, place *a*), tandis que les phages Vi n'ont produit aucune action (fig. 14, places *b*, *c* et *d*). Il s'agit ici, non plus d'une subculture de la variante Vi négative, mais d'une subculture de la variante Vi positive placée dans des conditions d'incubation qui ne permettent pas l'élaboration de l'antigène Vi.

Sur la boîte incubée à 37°, le phage CNV produit une lyse en partie masquée par une culture secondaire très irisée (fig. 13, place *a*) et des phages Vi, une lyse légèrement masquée par une culture secondaire non irisée (fig. 13, places *b*, *c* et *d*).

Des numérations de colonies développées par incubation à 18° et à 41°5 de plaques de gélose ensemencées avec des dilutions de la suspension initiale nous ont confirmé qu'à 18° la proportion des colonies Vi plus dépassait 90 p. 100, tandis qu'à 41°5 il ne s'en formait pas une seule. Malgré une importante diminution du nombre des colonies sur les boîtes incubées à 41°5, il faut bien admettre que la plupart des germes ayant donné naissance à des colonies Vi moins à cette température auraient formé à 18° des colonies Vi plus. Ce sont donc, non plus deux variantes différentes, mais la même variante qui, suivant qu'elle se développe dans des conditions permettant ou empêchant la formation de l'antigène Vi, se montre résistante ou au contraire sensible

Incubation à 20°



a b c d

Fig. 12

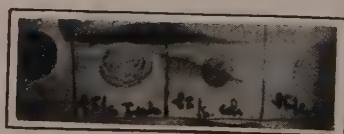
Incubation à 37°



a b c d

Fig. 13

Incubation à 41°



a b c d

Fig. 14

Fig. 12, 13 et 14. — *E. coli* Vi 2624/36 incubé à 3 températures différentes (20°, 37° et 41° 5. A 20°, la culture est très riche en antigène Vi; à 37°, il se forme environ 50 % d'éléments Vi négatifs; à 41° 5, il n'y a pour ainsi dire pas d'antigène Vi. a, phage CNV. Ce phage n'agit pas sur la culture Vi positive incubée à 20°; il produit une lyse masquée par une abondante culture Vi plus à 37°, (très forte irisation de la culture secondaire Vi plus, d'où l'aspect blanchâtre et nacré que présente l'emplacement de la goutte du phage CNV); à 41° 5, dans la culture entièrement Vi négative, il provoque une lyse totale; b, c et d, 3 phages Vi. Ces phages donnent une lyse incomplète, excès d'antigène Vi) dans la culture incubée à 20°, une lyse partiellement masquée par une culture secondaire non Vi dans la culture incubée à 37°, formée d'une quantité sensiblement égale d'éléments Vi plus et Vi moins. Ils n'ont pour ainsi dire aucune action sur la culture incubée à 41° 5, à peu près totalement dépourvue d'antigène Vi.

au phage CNV. Un pas de plus a donc été accompli dans la démonstration du rôle empêchant de l'antigène Vi à l'égard du phage en question.

10° FIXATION DU PHAGE CNV SUR LA CULTURE Vi MOINS D'*E. coli* 2624/36 ET NON-FIXATION SUR LA CULTURE Vi PLUS. — Les récepteurs spécifiques dont la présence sur les bactéries détermine la sensibilité de celles-ci à un bactériophage donné fixent les corpuscules de ce phage, même lorsqu'ils ont été séparés des germes. Cette fixation se traduit par une diminution importante du titre bactériophagique. Si l'on admet que la forme Vi plus et la forme Vi moins, obtenues par incubation à 18° et à 41°5 d'une même culture Vi plus, possèdent l'une et l'autre les récepteurs spécifiques du phage CNV (et il n'y a aucune raison de penser *a priori* qu'il puisse en aller autrement), la résistance de la forme Vi plus (incubée à 18°) au bactériophage CNV ne serait-elle pas la conséquence d'une action empêchante de l'antigène Vi sur l'adsorption des corpuscules par les récepteurs en question ? Pour élucider ce point, nous avons effectué plusieurs expériences de fixation suivant les techniques classiques.

Les résultats ont été très nets : les subcultures d'une colonie Vi plus, incubées à 41°5, donc à peu près totalement dépourvues d'antigène Vi, fixent le phage CNV dans une proportion supérieure à 99 p. 100 et ne montrent aucun pouvoir fixateur pour le phage Vi I. Inversement, les subcultures d'une colonie Vi plus, incubées à 18° ou à 37°, par conséquent riches en antigène Vi, ne fixent absolument pas le phage CNV, alors qu'elles fixent énergiquement le phage Vi I (tableaux IV et V).

TABLEAU IV. — Epreuve de fixation du phage CNV sur *E. coli* 2624/36 incubé à différentes températures.

PHAGE CNV	TITRAGES DU PHAGE CNV sur <i>E. coli</i> 2624/36 Vi-					CONCLUSIONS
	pur	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
Non traité (témoin).	LC	LC	+++	43	3	
Traité par une suspension dense (environ 5 milliards de germes par cm ³) d' <i>E. coli</i> 2624/36 incubé à 20° (culture Vi +)	LC	LC	+++	41	1	Pas de fixation.
Traité par une suspension identique d' <i>E. coli</i> 2624/36 incubé à 37° (culture Vi ±)	LC	LC	+++	20	1	Légère fixation.
Traité par une suspension identique d' <i>E. coli</i> 2624/36 incubé à 41°5 (culture Vi —)	50	2	0			Fixation énergique.

TABEAU V. — Epreuve de fixation du phage Vi I
sur *E. coli* 2624/36 incubé à différentes températures.

PHAGE Vi I	TITRAGES DU PHAGE Vi I sur <i>S. typhi</i> type A					CONCLUSIONS
	pur	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
Non traité (témoin)	LC	LC—	+++	++	30	
Traité par une suspension dense (environ 5 milliards de germes par cm ³) d' <i>E.</i> <i>coli</i> 2624/36 incubé à 20° (culture Vi +).	++	22	3	0		Fixation énergique.
Traité par une suspension identique d' <i>E. coli</i> 2624/36 incubé à 37° (culture Vi ±).	+++	++	15	2	0	Légère fixation.
Traité par une suspension identique d' <i>E. coli</i> 2624/36 incubé à 44°5 (culture Vi —).	LC	LC—	+++	18	4	Fixation presque nulle.

Il y a donc, entre la fixation des corpuscules et la présence de l'antigène Vi, une relation inverse pour le phage CNV et une relation directe pour le phage Vi I. L'antigène Vi joue le rôle de facteur entravant la fixation du phage CNV, comme il joue le rôle de facteur déterminant la fixation des phages Vi.

Ce rôle empêchant de l'antigène Vi sur la fixation du phage CNV explique pourquoi le bactériophage n'exerce aucune action lytique sur les cultures Vi plus de la souche 2624/36. La fixation est, on le sait, le premier acte de la bactériophagie. Sans elle, le processus lytique entier (multiplication, lyse, libération de corpuscules nouvellement formés) demeure suspendu. En empêchant la fixation, l'antigène Vi entrave par conséquent le déroulement du phénomène.

11° L'ANTIGÈNE Vi N'EXERCE PAS D'ACTION INACTIVANTE DIRECTE SUR LE PHAGE CNV. — Avant de conclure définitivement au rôle empêchant de l'antigène Vi sur la fixation, donc sur la lyse bactériophagique, il était nécessaire d'éliminer l'éventualité d'une inactivation (spécifique ou non spécifique) du phage CNV par l'antigène Vi :

Le phage CNV, mis en présence du filtrat d'une culture Vi plus de la souche *E. coli* 2624/36 âgée de quarante-huit heures, donc contenant une quantité importante d'antigène Vi, ne subit aucune inactivation, alors que, dans les mêmes conditions, les phages Vi sont inactivés dans des proportions considérables.

DISCUSSION.

L'antigène Vi n'exerce donc aucune action inactivante sur le phage CNV. Son rôle empêchant semble être purement et simplement celui d'une gaine isolante qui tient les corpuscules bactériophagiques éloignés des récepteurs bactériens spécifiques.

Il convient de faire remarquer que, dans le cas du phage CNV, c'est la présence d'un même antigène, l'antigène Vi, qui conditionne, d'une part, la sensibilité de la bactérie aux phages Vi et, d'autre part, sa résistance au phage CNV.

Un même antigène peut donc jouer, suivant le bactériophage considéré, deux rôles inverses, tantôt celui d'un facteur de sensibilité, tantôt celui d'un facteur de résistance.

RÉSUMÉ.

Les différents faits et expériences relatés ici autorisent à admettre que les antigènes, spécialement les antigènes d'enveloppe (antigène Vi, antigènes capsulaires A et L, etc.), mais très probablement aussi les antigènes somatiques, protègent les bactéries qu'ils entourent contre l'action de certains bactériophages.

Cette protection, dans le cas de l'antigène Vi d'*E. coli* 2624/36, est due à l'empêchement de la fixation des corpuscules bactériophages sur les bactéries.

Ce travail a été effectué avec l'assistance technique de M^{lle} J. Rembert, laborantine du C. N. R. S.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. MARCUS. *Zeitschr. Hyg.*, 1926, **105**, 17.
- [2] P. HADLEY. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1925-1926, **23**, 443.
- [3] F. M. BURNET. *Brit. J. exp. Path.*, 1927, **8**, 121.
- [4] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1929, **32**, 15.
- [5] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1934, **38**, 285.
- [6] P. LEVINE et A. W. FRISCH. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1932, **30**, 933.
- [7] P. LEVINE et A. W. FRISCH. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1933, **31**, 46.
- [8] P. LEVINE et A. W. FRISCH. *J. exp. Med.*, 1934, **59**, 213.
- [9] G. A. C. COUGH et F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1934, **38**, 301.
- [10] M. L. RAKIETEN, T. L. RAKIETEN et S. DOFF. *J. Bact.*, 1936, **32**, 505.
- [11] J. CRAIGIE et K. F. BRANDON. *J. Path. a. Bact.*, 1936, **43**, 233.
- [12] V. SERTIC et N. A. FOULGAKOV. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 35.
- [13] V. SERTIC et N. A. FOULGAKOV. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 887.
- [14] R. TH. SCHOLTENS. *J. Hyg.*, 1936, **36**, 452.

- [45] V. SERTIC. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 218.
- [46] V. SERTIC et N. A. BOULGAKOV. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 734.
- [47] R. TH. SCHOLTENS. *J. Hyg.*, 1937, **37**, 315.
- [48] M. L. RAKIETEN et T. L. RAKIETEN. *Yale J. Biol. Med.*, 1937, **10**, 191.
- [49] A. PIRIE. *Brit. J. exp. Path.*, 1940, **21**, 125.
- [20] J. BEUMER. *Acta Biol. Belg.*, 1940, **4**, 490.
- [21] M. L. RAKIETEN et S. BORNSTEIN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1941, **48**, 359.
- [22] M. L. RAKIETEN. *J. Bact.*, 1942, **43**, 102.
- [23] A. FELIX et B. R. CALLOW. *Brit. Med. J.*, 1943, **2**, 127.
- [24] J. CRAIGIE et A. FELIX. *Lancet*, 1947, **252**, 824.
- [25] J. BEUMER. *Rev. Belge Path. Med. exp.*, 1947, **18**, suppl.
- [26] A. GUELIN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 503.
- [27] P. BORDET et J. BEUMER. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 259.
- [28] J. BEUMER et QUERSIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1161.
- [29] E. M. MILLER et W. F. GOEBEL. *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 255.
- [30] W. F. GOEBEL. *J. exp. Med.*, 1950, **92**, 527.
- [31] A. FELIX et B. R. CALLOW. *Lancet*, 1951, **261**, 10.
- [32] P. NICOLLE, G. RITA et M. HUET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 2152.
- [33] P. NICOLLE, G. RITA et M. HUET. *Ces Annales*, 1951, **81**, 473.
- [34] A. JUDE et P. NICOLLE. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 1718.
- [35] A. JUDE et P. NICOLLE. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2028.
- [36] P. NICOLLE et A. JUDE. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 1922.
- [37] P. NICOLLE et A. JUDE. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2313.
- [38] A. JUDE, P. NICOLLE, SERVANT et SERVANT. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1011.
- [39] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1930, **33**, 647.
- [40] P. NICOLLE, A. JUDE et L. LE MINOR. *Ces Annales*, 1950, **78**, 572.
- [41] P. NICOLLE, L. LE MINOR et P. DUCREST. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1952, n^{os} 24, 25 et 26, 480 et 483.
- [42] A. FELIX. Symposium on the nature of virus multiplication, contribution to discussion. *Society for general Microbiology Oxford*, 16-17 avril 1952 (sous presse).
- [43] J. BEUMER. Symposium de Royaumont (Rapport sur les récepteurs des bactériophages). *Ces Annales*, 1953, **84**, 15.
- [44] A. BOIVIN et L. MESROBEANU. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 306.
- [45] S. KIMURA. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1925, **42**, 507.
- [46] E. W. MC CLOY. *J. Hyg.*, 1951, **49**, 114.
- [47] A. FELIX, S. S. BHATNAGAR et R. M. PITT. *J. exp. Path.*, 1934, **15**, 346.
- [48] P. BORDET. *Schw. Z. Path. u. Bakt.*, 1942, **5**, 18.
- [49] F. KAUFFMANN et G. VAHLNE. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 1945, **22**, 119.
- [50] F. KAUFFMANN. « Enterobacteriaceae », E. Munksgaard, édit., Copenhague, 1951, 179.
- [51] F. KAUFFMANN. « Die Bakteriologie der Salmonellagruppe », E. Munksgaard, édit., Copenhague, 1941.
- [52] F. KAUFFMANN. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 1941, **18**, 225.

LA SEMI-RÉSISTANCE AUX BACTÉRIOPHAGES

par R. WAHL.

(Institut Pasteur, Paris.)

Nous avons observé [1] que certaines souches bactériennes se comportent de façon hétérogène vis-à-vis de certains phages, en ce sens que ceux-ci, même employés en grand excès, n'infectent jamais qu'une partie assez faible des bactéries.

Nous dirons qu'une telle souche est semi-résistante au phage considéré et que ses bactéries sont les unes en état réceptif, les autres en état réfractaire vis-à-vis de lui.

A partir d'une bactérie quelconque réceptive ou réfractaire d'une souche semi-résistante, on obtient toujours à nouveau une population semi-résistante, c'est-à-dire en partie réceptive et en partie réfractaire. Toutes les bactéries d'une souche semi-résistante paraissent donc appartenir au même génotype, le type semi-résistant.

Au contraire, à partir d'une bactérie sensible au sens classique, on n'obtient, sauf mutations, que des bactéries sensibles et de même, à partir d'une bactérie résistante, on obtient une culture résistante.

Par ailleurs, nous avons constaté que les souches sensibles classiques peuvent produire, aussi bien que des mutants résistants, des mutants semi-résistants qui sont à l'origine de cultures secondaires semi-résistantes, qu'il est intéressant également d'étudier.

Il doit être précisé que la semi-résistance ne peut être définie que vis-à-vis d'un phage déterminé et que la même souche peut se comporter suivant le phage auquel on l'oppose comme résistante, semi-résistante ou sensible.

Nous étudierons ici : Les souches semi-résistantes, et les cultures secondaires semi-résistantes des souches sensibles.

Nous ne reviendrons pas sur la description des techniques qui ont été faites dans les publications citées plus haut.

LES SOUCHES SEMI-RÉSISTANTES

Il existe des souches semi-résistantes chez des espèces bactériennes aussi différentes les unes des autres que *Shigella parady-*

sentieræ, *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhi* murium, et *Staphylococcus pyogenes*. Il est probable qu'il s'en trouve chez toutes les espèces pour lesquelles on connaît des phages actifs.

Nous prendrons comme exemple la souche IV, de *Shigella paradysenteriae* Y6R. Cette souche a été isolée à partir d'un mutant de la souche sensible O. Elle est semi-résistante vis-à-vis du phage S₁₃. Nous montrerons sur cet exemple les caractères communs à toutes les souches semi-résistantes (ceux qui les distinguent des souches sensibles), et les différences pouvant exister entre elles, qui correspondent, comme nous le verrons, à des différences de *réactivité*.

Ces caractères concernent la lyse sur milieu gélosé, l'adsorption des phages sur les bactéries et l'infection de celles-ci, la production des phages par les bactéries infectées, l'influence de la concentration de certains ions sur la réceptivité des bactéries.

I. — LYSE SUR MILIEU GÉLOSÉ.

1° *Les plages* doivent être étudiées au point de vue de leur nombre, de leur taille et de leur aspect.

Le nombre des plages produites sur une souche semi-résistante par une même dilution d'une même préparation de phages est plus variable que sur une souche sensible. Les écarts ne sont cependant pas tellement grands qu'il ne soit possible de déterminer, pour chacune des dilutions différentes choisies, un nombre moyen de plages produites sur la souche. Ces nombres ne sont pas proportionnels aux dilutions, contrairement à ce qui se passe pour une souche sensible. Par ailleurs, le rapport entre le nombre des plages produites sur une souche semi-résistante et sur une souche de même espèce et sensible au même phage est toujours inférieur à l'unité. Mais il peut varier de 75/100 à moins de 1/100. Il est environ de 1/100 pour la souche IV. Nous ignorons si cette règle vaut pour une comparaison avec une souche sensible d'une autre espèce (au moins d'une espèce voisine).

La taille des plages diffère suivant la souche. C'est ainsi que, sur la souche IV le phage S₁₃ produit des plages de 0,25 à 1 mm de diamètre, sur la souche O des plages de 5 mm. En général, les plages produites sur les souches semi-résistantes sont plus petites que celles produites par le même phage sur les souches sensibles de même espèce, mais elles peuvent être de même taille. S'il en est ainsi, on constate souvent que dans le cas de la souche semi-résistante la lyse est plus complète dans la zone centrale de la plage qu'à sa périphérie.

Sur certaines souches semi-résistantes, telles que la souche IV, une bonne partie des plages ont des *contours irréguliers*. Sur

d'autres souches semi-résistantes les plages sont parfaitement arrondies. Sur les souches sensibles, les contours des plages sont plus réguliers.

Le fond des plages produites par le même phage sur diverses souches semi-résistantes a des aspects différents suivant la souche. On trouvera leur description dans les mémoires déjà cités.

II. — PRODUCTION GLOBALE DES PHAGES PAR UNE POPULATION SEMI-RÉSISTANTE INFECTÉE.

En milieu liquide la production globale de phages par une population semi-résistante infectée est, toutes choses égales d'ailleurs, plus lente, plus faible que celle d'une population sensible et elle n'aboutit jamais à une lyse massive.

Nous avons donné [4] une méthode quantitative pour comparer cette production globale de phages chez diverses populations semi-résistantes et sensibles.

III. — ADSORPTION. BACTÉRIES RÉCEPTIVES.

Ajoutons le phage S13 à raison de 1 phage pour 10^4 bactéries à des suspensions de cultures sensibles et semi-résistantes en eau peptonée, et titrons les phages non adsorbés après un temps déterminé. On trouvera, par exemple, que la souche sensible aura adsorbé 96 p. 100 des phages, alors que l'adsorption sur la souche semi-résistante n'est pas décelable. Si maintenant l'on ajoute le S13 à raison de 10^4 ϕ par bactérie et que l'on dénombre les centres infectieux après un temps donné, on constate que dans la souche sensible 64 p. 100 des bactéries ont été infectées, et 0,7 p. 100 dans la souche IV. Pour d'autres souches semi-résistantes, on trouve des valeurs intermédiaires.

Dans une souche semi-résistante, il n'y a donc qu'une faible proportion de bactéries qui adsorbe des phages. Cependant, on verra que dans une telle culture semi-résistante, les bactéries réfractaires donnent constamment naissance à des bactéries réceptives.

Apparition de bactéries réceptives pendant la croissance bactérienne en présence de phages. — Les deux expériences suivantes montrent cette apparition :

a) On infecte toutes les bactéries réceptives d'une population et on les dénombre. On introduit dans un milieu neuf une petite portion de cette population, et on constate que la multiplication des phages se prolonge longtemps, et que leur nombre final est élevé. C'est donc que, après la lyse de toutes les bactéries réceptives qui étaient présentes au début, de nombreuses bactéries réceptives n'ont cessé d'apparaître dans la descendance des bactéries réfractaires.

b) On dilue une suspension bactérienne dense dont toutes les bactéries réceptives ont été infectées, de façon à obtenir des colonies séparées sur une plaque de gélose. Celles-ci sont donc issues de bactéries réfractaires. Les subcultures faites à partir de chaque colonie contiennent de nombreuses bactéries réceptives.

IV. — RENDEMENT INDIVIDUEL MOYEN EN PHAGES DES BACTÉRIES.

Ce rendement moyen a été évalué pour deux souches de *Shigella paradysenteriae*, la souche IV, semi-résistante et la souche O, sensible.

Il était, dans les deux cas, de 25 phages par bactérie. Ceci montre que la faible production de phages par les populations semi-résistantes s'explique exclusivement par la faible proportion des bactéries réceptives.

V. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CERTAINS IONS SUR LE COMPORTEMENT DES BACTÉRIES SEMI-RÉSISTANTES VIS-A-VIS DU PHAGE.

Nous avons montré [2-3] que l'interaction des phages et des bactéries exige souvent certaines conditions de concentrations des ions PO_4^{4-} et Ca^{++} dans le milieu et un certain équilibre entre leurs concentrations respectives. Plus précisément le phage ne se multiplie que si la concentration de Ca^{++} est comprise dans une certaine zone (entre un maximum et un minimum) et la concentration de PO_4^{4-} inférieure à un maximum.

Nous avons constaté que les souches semi-résistantes de *Shigella paradysenteriae* étudiées exigeaient pour la reproduction du phage plus de calcium et toléraient moins de phosphore que la souche sensible O.

Par exemple la souche IV ne produisait du phage que pour des concentrations de Ca supérieures à 2×10^{-3} M et les concentrations moléculaires de PO_4^{4-} ne devaient pas dépasser celles de Ca^{++} . Pour que la souche sensible O produise du phage il suffisait que la concentration de Ca^{++} atteigne $3,2 \times 10^{-4}$ M et que celle de PO_4^{4-} soit inférieure à 4×10^{-2} M.

La valeur optima du rapport $\text{Ca}^{++}/\text{PO}_4^{4-}$ est aux environs de 1 pour la souche IV et de $2,4 \times 10^{-2}$ pour la souche sensible.

Nous avons montré [4] que les concentrations trop élevées de PO_4^{4-} bloquent le premier temps de la reproduction du phage de *Shigella* par les bactéries de la souche sensible O, mais n'empêchent pas l'adsorption du phage. Nous ne pouvons dire actuellement s'il en est de même pour les souches semi-résistantes et si ces concentrations trop élevées n'agissent pas sur la conversion des bactéries réfractaires en bactéries réceptives.

LES CULTURES SECONDAIRES SEMI-RÉSISTANTES APRÈS LA LYSÉ DES SOUCHES SENSIBLES

On sait qu'après la lyse par le phage d'une population de bactéries sensibles, quelques mutants survivent. Ils peuvent être résistants ou semi-résistants. Ce dernier cas seul nous intéresse ici.

Une souche sensible qui produit des mutants semi-résistants à un phage présente les particularités suivantes [3] :

1° *Sur gélose* : les plages produites par ce phage présentent une zone centrale bien percée de lyse totale, et une zone périphérique semée de nombreuses colonies secondaires.

Après une lyse massive par le phage concentré, le nombre de colonies secondaires n'est pas égal à celui des mutants semi-résistants réfractaires de la population, car ceux d'entre eux dont toute la descendance est réceptive ne donnent pas de colonies. D'autres, dont une partie de la descendance est réceptive, donnent des colonies irrégulières, encochées, ou très petites. On n'obtient un nombre de colonies égal à celui des mutants qu'en présence de sérum antiphage. Les colonies sont alors toutes normales.

2° *En milieu liquide*, si l'on soumet à l'action d'un excès de phages des populations de différentes concentrations, provenant d'une telle souche, on constate les faits suivants :

Après un certain délai survient une lyse massive. S'il y a des mutants semi-résistants, une culture secondaire semi-résistante se développe. La courbe de croissance de celle-ci est très irrégulière, bien différente de l'exponentielle habituelle. L'allure générale de ces courbes est la même que celle des cultures semi-résistantes où un nombre très petit de bactéries a étéensemencé avec un très grand excès de phages.

En effet, les conditions sont les mêmes, les phages s'étant fortement multipliés aux dépens des bactéries sensibles et les mutants semi-résistants étant en petit nombre.

La croissance de la culture secondaire semi-résistante est précédée d'une phase stationnaire ou de bactériostase de durée très variable (quelques heures à plusieurs jours) pendant laquelle les numérations de bactéries viables, faites en présence de sérum antiphage, donnent un chiffre à peu près constant. (En l'absence de sérum les colonies sont très rares, irrégulières, ou même absentes.)

L'allure de la croissance est ensuite très variable suivant la souche, et la courbe peut présenter les particularités suivantes :

1° La vitesse de croissance souvent faible varie suivant les moments, elle peut s'annuler passagèrement une ou plusieurs fois.

2° Des effets lytiques s'inscrivent parfois sur la courbe.

3° La durée totale de la croissance peut aller de quelques heures à plusieurs jours.

4° Le degré d'opacité finalement atteint par la culture secondaire est souvent beaucoup plus faible que celui d'une culture normale.

Ces diverses anomalies ne sont pas indépendantes :

1° En général, quand la phase stationnaire est courte, la croissance est assez rapide, continue, de courte durée et aboutit finalement à une opacité assez marquée.

2° Quand la phase stationnaire est longue, la culture reste souvent très maigre. Dans ce cas, ou bien la croissance s'arrête très vite, ou bien elle se poursuit lentement avec des arrêts prolongés, et finalement l'opacité reste faible.

Cependant divers cas intermédiaires peuvent s'observer, et la culture secondaire semi-résistante peut même se lyser.

DISCUSSION

L'étude des bactéries semi-résistantes pose de nombreux problèmes ; nous en évoquerons ici deux seulement : 1° la signification génétique de ces bactéries ; 2° l'interprétation de leurs réactions vis-à-vis du phage.

1° SIGNIFICATION GÉNÉTIQUE DES BACTÉRIES SEMI-RÉSISTANTES.

Les bactéries semi-résistantes peuvent se rencontrer dans la nature ou provenir d'une mutation. La réalité de cette mutation et son indépendance du phage ne paraît pas contestable. En effet, on peut isoler des clones semi-résistants à partir des souches qui n'ont pas subi l'action du phage correspondant. Dans une même souche sensible peuvent apparaître à la fois des mutants résistants et des mutants semi-résistants ; c'était le cas pour la souche O de *Shigella paradysenteriae* Y6R où les colonies semi-résistantes étaient plus grandes que les colonies résistantes.

La mutation est caractérisée dans les cas que nous avons étudiés : d'une part, par l'aptitude des bactéries à se trouver dans deux états différents, un état réfractaire et un état réceptif. La conversion d'un état à l'autre peut être comparée à certaines dissociations en variantes R et S. Les deux états réceptif ou réfractaire sous lesquels peut se trouver la bactérie semi-résistante paraissent correspondre à des différences d'ordre phénotypique. En effet, toute bactérie provenant d'une souche semi-résistante donne des descendants appartenant à chacune des variétés.

L'équilibre qui s'établit finalement entre ces deux variétés est

à peu près constant pour une souche donnée, mais le mécanisme responsable de cet équilibre n'apparaît pas clairement.

2° INTERPRÉTATION DES RÉACTIONS DES POPULATIONS SEMI-RÉSISTANTES.

Les réactions des diverses populations semi-résistantes vis-à-vis du phage s'expliquent par les trois caractères que nous avons étudiés dans ce travail :

1° Les bactéries y sont les unes en état réfractaire, les autres en état réceptif.

2° Après la lyse de toutes les bactéries réceptives par le phage, de nombreuses bactéries parmi les survivantes passent de l'état réfractaire à l'état réceptif.

Ces réactions expliquent les caractères des plages sur gélose et ceux de la production de phages en milieux liquides.

Caractères des plages sur gélose. — A. Seuls les phages qui rencontrent une bactérie réceptive sont susceptibles de se reproduire. Sur gélose la production d'une plage exige, de plus, que des états réceptifs apparaissent chez les bactéries réfractaires voisines de la première bactérie infectée et que celles-ci étant lysées à leur tour, le même phénomène se poursuive de proche en proche. C'est pourquoi les plages sont *moins nombreuses* que sur une souche sensible.

B. Les bactéries réceptives apparaissent en nombre restreint dans chaque génération ; l'extension des plages est lente, et les plages sont *petites et parfois irrégulières*. Pour les mêmes raisons la lyse peut être plus marquée dans la zone centrale de la plage (faux aspects de plages auréolées). Les plages secondaires périphériques se forment probablement autour d'une bactérie qui passe à l'état réceptif plus vite que les bactéries voisines.

Production des phages en milieu liquide. — En milieu liquide, les phénomènes sont comparables et les lyses se succèdent en plusieurs temps. C'est pourquoi la production de phages est lente et progressive, puisqu'elle se fait d'abord aux dépens des bactéries réceptives présentes dans l'état initial, puis aux dépens de celles qui apparaissent dans les générations successives.

COMPARAISON DE DIVERSES SOUCHES SEMI-RÉSISTANTES.

Nous avons constaté que chaque souche semi-résistante comporte une proportion de bactéries réceptives vis-à-vis d'un même phage qui lui est propre. Il est probable que chez chacune la fréquence des apparitions d'états réceptifs dans la descendance des bactéries réfractaires est aussi un caractère propre.

Nous dirons que ces caractères définissent la *réactivité* de chaque souche vis-à-vis du phage.

Nous avons décrit, dans un travail antérieur, les méthodes d'évaluation de la réactivité [4]. Nous nous contentons ici d'indiquer que les plages sont, toutes choses égales d'ailleurs, d'autant moins nombreuses, plus petites et plus irrégulières ; que la production de phages est d'autant plus restreinte, que la lyse est d'autant moins marquée que la réactivité est plus faible.

La notion de réactivité peut être étendue aux souches sensibles, en considération des réactions de leurs cultures secondaires semi-résistantes.

Cette notion de réactivité s'accorde mieux avec les faits relatés ci-dessus que celle de *virulence des phages*, car alors qu'une partie seulement des bactéries d'une population semi-résistante est réceptive, on constate que les phages correspondants ont tous le même pouvoir infectant pour ces bactéries. Nous renvoyons, pour les expériences correspondantes, aux publications déjà citées.

On trouvera dans le tableau I un exemple de comparaison de quelques souches, au point de vue des caractères qui servent à évaluer la réactivité.

TABLEAU I. — Evaluation de la réactivité de quelques souches semi-résistantes au même phage. (Clas ées par activités croissantes.)

NUMÉRO des souches	PHAGES producteurs de plages p. 100	TAILLE des plages en mm	CONTOURS des plages	BACTÉRIES réceptives p. 100
1.	1	0,2 à 1	Irrégulier	0,7
2.	1	1	Régulier.	1
3.	10	3	Régulier.	
4.	50 à 75	4 à 5	Régulier.	50 à 75

RÉSUMÉ

1° Les souches « semi-résistantes » renferment des bactéries dans deux états différents : les unes sont réfractaires, les autres réceptives au phage considéré.

2° Les bactéries réfractaires ne paraissent pas adsorber de phages.

3° Après la lyse par le phage des bactéries réceptives d'une population semi-résistante, il apparaît de nouvelles bactéries réceptives dans la descendance des bactéries réfractaires.

4° Les concentrations de Ca^{++} et de PO_4^{--} compatibles avec la multiplication du phage sont différentes pour les souches semi-résistantes et pour les souches sensibles de *Shigella paradysenteriae* Y6R.

5° On peut dire que chaque souche semi-résistante à un même phage est caractérisée par une *réceptivité* différente vis-à-vis de lui.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 29, 44, 194, 266.
- [2] R. WAHL. *Ces Annales*, 1946, **72**, 73.
- [3] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 137 ; 1951, **80**, 155.
- [4] R. WAHL. *Ces Annales*, 1952, **83**, 464.
- [5] R. WAHL. *Ces Annales*, 1952, **83**, 653.

FURTHER STUDIES ON THE MEMBRANE OF "E. COLI" B

by W. WEIDEL.

(Max Planck-Institut f. Biologie, Abt. Melchers.)

In a preceding paper [1] the preparation and properties of the cell membrane of *E. coli* B have been described. These membranes which are still capable of specific adsorption of phages T2, T4 and T6, turned out to consist of lipoprotein.

Meanwhile membrane preparations from 6 different 10 l-cultures of B have been analysed separately for their main components (HCl-hydrolysate, lipid, H₂SO₄-soluble substance) to test the constancy of composition. The following values were obtained (percent of dry material) [table 1].

TABLE I.

Raw lipid	8,5 — 11,3	av. 10,4.
H ₂ SO ₄ -soluble	8,2 — 11,1	av. 9,4.
Rest:	Water soluble, acid hydrolysate.	

Taking into account the complex nature of the analysed material, the composition appears rather constant.

Special attention was paid to the *sulfuric acid soluble material*. It was surprising to find that this material, which as described already [1] is clearly soluble in concentrated sulfuric acid with reddish-brown color, and can be precipitated from the solution by dilution with water without apparent alteration as a yellow precipitate, is *still lipoprotein*. Complete hydrolysis is impossible with conc. HCl even when boiling with it for days and can be attained only with 80 % H₂SO₄. After 2 hours on the boiling water bath one obtains a yellow hydrolysate with brown drops of lipid swimming on top. The amino acids of the hydrolysate do not seem to differ much from those of the HCl-hydrolysate of the total membrane mentioned above (preliminary paper chromatograms). The lipid in this case consists of two parts: one is soluble in petrol-ether/ethyl-ether like the lipid obtained by HCl-hydrolysis of whole membranes, the other one is only soluble in alcohol. Each part amounts to 15 % of the dry H₂SO₄-soluble material.

Further separation of aminoacids and lipids was postponed in favor of more experiments on the properties of receptors

for T1, T5, T3 and T7 which are lost in the course of membrane preparation adopted so far. Bacterial membranes as found in lysates after lysis from within or without seemed suitable for the purpose. We tested raw lysates — heated and not heated — as well as centrifuged and washed membranes from lysates. Lysates were prepared with all phages of the T series except T7; adsorption tests were done likewise with all phages as far as resistance patterns of plating bacteria permitted it. Plating bacteria were always B-mutants resistant at least to the lysing phage. Quite generally the following picture was obtained [table 2] (1).

TABLE II.

PHAGES TESTED LYSATE FROM	T2	T6	T4	T3	T7	T5	T1
T2, T2r	/	+++	+	(+)	(+)	++++	++
T6.	+++	/	++	(+)	(+)	+++	++
T4.	+++	+++	/	(+)	(+)	++++	++
T3.	+++	+++		/	(+)	++++	++
T7.					/		
T5.	++++	+++	+++	+	+	/	—
T1.	++++	+++	+++	(+)	(+)	—	/

Each + indicates about 25 % of phage input adsorbed (10 min./37°, for T5 20 min.).

From table II one can see the following :

1° *Receptors for T2, T6 and T4* are practically never destroyed completely by any lysing phage. But the T2-receptor is by far the least sensitive whereas the T4-receptor appears to be quite apt to destruction. T6-receptor is intermediate.

2° *Receptors for T3 and T7* are strongly impaired by any kind of lysis and resemble in this respect somewhat T4-receptor.

3° *Adsorption of T1* usually becomes reversible in lysates (total adsorption mixture shows no decrease in T1 titer, but the supernatant after low speed centrifugation does) and the rate is reduced.

(1) It should be mentioned that lysates stemming from partially resistant bacteria never inactivated those phages against which the bacteria were resistant. Inactivation therefore cannot be the unspecific effect of bacterial enzymes leaving the cell upon lysis. Indifference of results against heating of the lysates (1 h/60°) points in the same direction.

4° *T5-receptor* can stand any lysis except that with *T1* (this is also true vice versa).

Usually one finds after lysis or other treatments of the membrane an increased demand for the correct ionic milieu on the part of the phages in order to be well adsorbed (if at all). *T1*, *T3* and *T7* need 10^{-3} M Mg^{++} and as little NaCl as possible. *T2*, *T4*, *T5* and *T6* need 10^{-1} M Na^{+} . *T4* and *T6* are often better adsorbed in the presence of broth than in pure NaCl-buffer.

Very revealing indeed seems to be the « type » of lysis. According to the effects produced by phages on bacteria if mixed with them in salt-buffer solutions one can divide the phages clearly into 4 groups :

1° *T2*, *T4* and *T6* turn a dense bacterial suspension (10^{10} - $10^{11}/cm^3$) in NaCl-buffer within 5 to 10 minutes at 37° (strong temperature dependence !) into a thick, slimy, opaque mass (multiplicity of infection around 20 or more). Under the phase contrast microscope one sees in such « lysates from without » nothing but membranes completely torn to pieces or blown up into balloons of all sizes. The same picture is offered by ordinary « lysates from within ».

2° *T3* and *T7* yield very similar membranes when lysing from within. From without (in $MgSO_4$ -buffer) they produce them only if the bacteria are practically saturated with phage, and even then rather slowly.

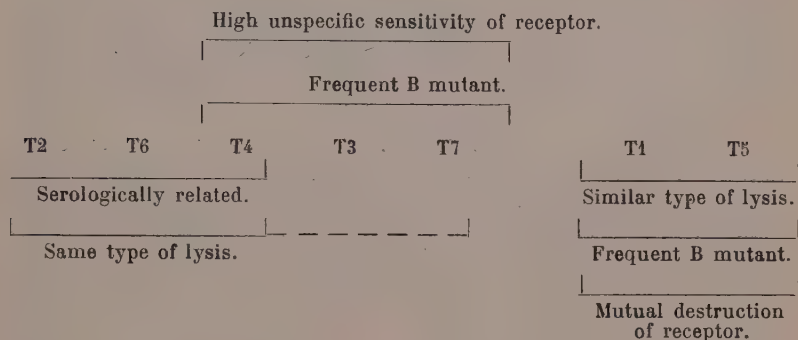
3° *T5* at low and intermediate multiplicities does not change the appearance of bacteria in NaCl-buffer. Near the saturation point the bacteria swell strongly, some of them lose their cytoplasm, deformations occur, but are comparatively rare. Ordinary lysates of *T5* look similar. The great number of apparently unlysed bacteria seems characteristic.

4° *T1* does not produce any visible effect on bacteria even at highest multiplicities in $MgSO_4$ -buffer. Ordinary lysates contain many oblong membranes, almost empty, and some smaller « balloons ».

Fig. 1 represents an arrangement of the T-phages in groups which have a special bearing on certain properties of the B-membrane, the structure of which might now be depicted in a first approximation :

1° The basic and very stable structure of the complete B-membrane consists of lipoproteid. It can be obtained as such in the form of chemically prepared membranes [4] and represents the « substrate » for the chemical attack by phages *T2*, *T4* and *T6* (and perhaps also of *T3* and *T7*) which comes into play in the second irreversible and temperature dependent step of adsorption and leads to invasion or — under suitable conditions — dis-

FIG. 1.



ruption of the protecting membrane (lysis from without, see also [1]).

2° A second, independent component, « substrate » for T5 (and possibly T1) is imbedded into this basic frame, and adsorption and invasion of these phages take place via the second component without involving the lipoprotein framework. The shape of the cell is maintained therefore under conditions, which in the case of T2, T4 and T6 (T3 and T7) lead to fast destruction (lysis from within or without). These latter phages on the other hand, although destroying the supporting framework of the cell wall, leave the « second component » untouched. In support of this view it has been found, that bacteria loaded with T1 or T5 can still be lysed from without promptly with T2, whereby the cell wall is torn as usual. Upon lysis from within phages T1 and T5 possibly ooze out of the cell through holes in the membrane which previously have been filled by the material of the « second component ».

3° This binary structure of the cell wall of *E. coli* B. bears a mosaic of areas which function as *primary* receptors for phages. According to Puck et al. [2] these primary receptors act merely by electrostatic patterns and forces. Without being definite chemical substances, they could well be represented by a defined spatial arrangement of certain chemical radicals like carboxy- and aminogroups protruding from the membrane sheet which is formed by the two components mentioned above. They are much more sensitive against external (chemical) and internal (mutational) influences than are the « substrates » — especially primary receptors for T3, T4, T7 and T1 — which is not difficult to understand. But in spite of their importance under natural conditions (initial fixation of the phage particle) they are not *essential* for infection. B/2 which lacks the primary receptor

for T2 can nevertheless be infected with T2 by substituting mechanically forced contact for electrostatic attraction [3].

On account of earlier observations [1] it has already been assumed that the even numbered phages, especially T2, are capable of a *direct* chemical attack upon the lipoprotein structure. The following experiments support this view :

1° T2 disrupts not only living bacteria (lag and exponential) under conditions which promote lysis from without, but also bacteria inhibited by cyanide or killed by dilute NaOH, formalin or heat. Participation of bacterial enzymes in the process of disruption appears to be highly improbable therefore.

2° A freshly prepared, viscous lysate of B + T2 (lysis from without in buffer) when mixed with a sediment of fresh B does not lyse or kill these bacteria even after prolonged contact (15 min./37° + 45 min./room temp.). Despite the high concentration of cytoplasm from the prelysed cells there is no action upon intact cells. Disruption is not the result of an activation by the adsorbed phage or a bacterial enzyme which in turn attacks the membrane.

By the use of certain more or less specific chemical reagents it was possible to throw still more light on the structure of the complete B-membrane :

1° *Formaldehyde* increasingly inactivates T5-receptor with increasing concentration. T2-4-6-receptors are left intact, T1-3-7 are reduced in activity.

2° *Periodic acid* and *nitrite* behave rather similar to formaldehyde as regards T5-receptor. T2-receptor remains intact, the others are strongly reduced in activity or destroyed — probably in an unspecific manner by the mere action of H⁺. Weak acid does the same to T1-3-4-7.

3° *n/60 NaOH* seems to remove T5-receptor from B-cells without loss of activity according to our latest experiments. The cells remain active at least against T2 after this treatment.

These results again point out quite clearly that the T5-receptor is a component by itself of the coli cell wall. It could be a carbohydrate-protein-complex according to its chemical behaviour. On the other hand the outstanding stability of the T2-receptor is remarkable. Means to destroy it specifically have not yet been found. The activity may reside in one of the fatty acids of the lipoprotein.

The (primary) receptors for T3, T4 and T7 are too sensitive against the most unspecific influences for easy characterization.

The close resemblance between phages T2, T4 and T6 not only from a serological point of view but also as to their chemical activity against the lipoprotein structure supports the idea that they possess the same agent for destruction of the membrane.

but differ with respect to the electrostatic pattern of their surface. This makes them dependent on different receptor areas on the cell surface for initial attachment.

Details of experiments mentioned in this survey will be published elsewhere.

BIBLIOGRAPHY

- [1] W. WEIDEL. *Zeitschr. Naturforsch.*, 1951, **6 b**, 251-259.
- [2] Th. T. PUCK, A. GAREN and J. CLINE. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 65-88.
A. GAREN and Th. T. PUCK. *J. exp. Med.*, 1951, **94**, 177-189.
- [3] W. WEIDEL. *Zeitschr. Naturforsch.*, 1952, **7 b**, 145-148.

**CHEMICAL AND ANTIVIRAL PROPERTIES
OF THE SOMATIC ANTIGENS OF PHASE II "SH. SONNEI"
AND OF A PHAGE-RESISTANT VARIANT, II/3, 4, 7**

by WALTHER F. GOEBEL and MARGERIS A. JESAITIS.

(*The Rockefeller Institute for Medical Research, New York.*)

The extraordinary specificity which characterizes the union between phage and susceptible microorganism must be governed, in the last analysis, by the precise chemical structure of the substances distributed on the surface of the infectious agent and the microorganism which it attacks. We can say very little regarding the chemical nature of the viral component which enters into specific combination with the bacterial cell, but in regard to the latter, there is evidence, in a number of instances, that it is the surface antigen with which the virus combines when the infective process is initiated. A number of investigators have shown that bacterial extracts have the ability to inactivate *in vitro* those phages to which the cell is susceptible. The chemical nature of the active agent in such extracts has not been fully characterized, yet evidence has been brought to bear which indicates that these materials may be carbohydrate in nature, or that they might be more complex molecular substances in which immunologically active carbohydrate is incorporated. In addition, evidence from serological tests supports the opinion that the active principle may well be identical with the type-specific agglutinin of the microorganism in question.

Several years ago a study was undertaken in our laboratory of the somatic antigen of Phase II *Sh. sonnei*. This microorganism is susceptible to five of the seven T coli-dysentery phages; it is attacked by T₂ and T₆ and by T₃, T₄ and T₇ as well. The antigen of Phase II *Sh. sonnei* was first isolated from microorganisms which had been killed with 1 per cent formalin. The purified material contained some 5.5 per cent of nitrogen and 3.1 per cent of phosphorus; it yielded 24 per cent of reducing sugars on hydrolysis, and it was characterized as a lipocarbohydrate-protein complex. Shortly after the *sonnei* antigen was described, it was found that it had the ability to inactivate *in vitro*, and in exceedingly small amounts, the T₃, T₄ and T₇ coli-dysentery phages.

It did not, however, have any action on T_2 or T_6 . By employing different isolation procedures we have, during this past year, succeeded in obtaining the Phase II *sonnei* antigen in a state less degraded than that of preparations hitherto described. The antigen prepared by these newer techniques contains 11.7 per cent of nitrogen and 1.2 per cent of phosphorus and yields 8.2 per cent of reducing sugars on hydrolysis. This substance has been termed a « lipomuco-protein ». It retains all of the serological specificity exhibited by the intact cell, and in addition has the ability to inhibit *in vitro* all five of the T phages to which the Phase II bacillus itself is susceptible.

If the hypothesis that the chemical structure of the surface antigen of phase II *Sh. sonnei* determines its ability to combine with these five T viruses has any basis in fact, then it should be possible to demonstrate differences in the chemical make-up of this antigen and that derived from a phage-resistant variant of the Phase II organism. Such a variant has been obtained by plating a large population of Phase II bacilli with a mixture of T_3 , T_4 and T_7 phages. The mutant cell, termed II/3, 4, 7, has been isolated free of phage and is not lysogenic.

The variant *sonnei* organism produces two types of colonies, large and small, which differ in their morphological characteristics one from another and from the parent. Colonies of the small variant are slightly rougher than those of the Phase II bacillus, but they are not nearly as rough as those of the larger colony-producing variant. Exhaustive serological and chemical studies have revealed that the two variant microorganisms are immunologically identical, and that they elaborate identical type-specific antigens. Both variants breed true on subculture; they do not back-mutate to the parent under appropriate growth conditions. Large quantities of the small-colony bacillus have been grown. By extracting cells previously killed with 1 per cent aqueous phenol with distilled water at 60° C., it has been possible to obtain serologically active material which can be purified by repeated isoelectric precipitation. The substance thus obtained cannot be further fractionated by this or by a variety of other means employed, and has been found to be electrophoretically homogeneous. It contains some 11 per cent of nitrogen and 1 per cent of phosphorus, and resembles very closely in its gross analytical properties the antigen derived by similar means from the parent Phase II bacillus.

Before proceeding with a description of the chemical differences of the antigen derived from the parent Phase II bacillus and that obtained from the phage-resistant variant, let us first examine their immunological characteristics, and those of the microorganisms from which they were obtained. A study of the serological

relationship of Phase II *Sh. sonnei* and the mutant, II/3, 4, 7, reveals that the variant is not agglutinated by the sera of animals immunized with the parent Phase II bacillus (table I). From

TABLE I. — Agglutination Reactions of Phase II *Sh. sonnei* and of the Phage-resistant Variant II/3, 4, 7 in Antibacterial Immune Sera.

SÉRUM of rabbit immunized with	MICRO- ORGANISM tested	FINAL DILUTION OF ANTISERUM						
		1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200
II bacilli	II	+++	++++	++++	++++	+++	++±	+
	II/3, 4, 7	0	0	0	0	0	0	0
II 3, 4, 7 bacilli . .	II	+++	++++	++++	++±	++	0	0
	II/3, 4, 7	+++	++++	++++	++++	+++	+	0

this it is evident that the two bacilli are not identical and it would appear at first sight that they are serologically unrelated. Further examination of the immunological properties of the antiserum evoked by the variant microorganism reveals, however, that there is indeed a cross-immunological relationship between the two organisms, for sera elicited by the variant agglutinate both microorganisms. It will be noted that this relationship is not reciprocal, yet this phenomenon is by no means unusual. Its counterpart has been observed on numerous occasions in this laboratory during our extensive studies on the immunological properties of azo-protein antigens prepared by coupling the amino phenol and benzyl glycosides of mono- and di-saccharides of known chemical structure with protein.

Since both bacterial antigens in question, that from the Phase II bacillus and from its variant, II/3, 4, 7, have been obtained in a state of high purity, at least insofar as we have been able to ascertain, it is possible to obtain monovalent antisera by immunizing experimental animals with solutions of the two *antigens* themselves. An examination of the agglutination reactions of the two microorganisms in these sera reveals a pattern identical with that found in the case of the antibacterial sera (table II). From the results of these serological tests it can be stated with reasonable certainty that type specificity is conferred upon each organism by the lipomucoprotein, and that it is this complex which is the predominant surface antigen of the cell in question. If one examines the precipitin reactions of the two antibacterial sera (table III), as well as those of animals immunized with the two chemically purified antigens themselves, using the latter as precipitinogens,

TABLE II. — Agglutination Reactions of Phase II *Sh. sonnei* and of the Phage-resistant Variant II/3, 4, 7 in Anti-antigen Immune Sera.

SERUM of rabbit immunized with	MICRO- ORGANISM tested	FINAL DILUTION OF ANTISERUM						
		1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200
II antigen.	II	+++	+++	+++	++	+	±	0
	II/3, 4, 7	0	0	0	0	0	0	0
II/3, 4, 7 antigen.	II	+++	+++	+++	++	+	0	0
	II/3, 4, 7	+++++	+++++	+++++	+++++	+++	+	±

TABLE III. — Precipitin Reactions of the Somatic Antigens of Phase II *Sh. sonnei* and of the Phage-resistant Variant II/3, 4, 7 in Antibacterial Immune Sera.

SERUM of rabbit immunized with	SOMATIC antigen tested	FINAL DILUTION OF ANTIGEN				
		1 : 2 000	1 : 10 000	1 : 50 000	1 : 250 000	1 : 1 250 000
II bacilli	II	+++	+++±	++	+	±
	II/3, 4, 7	0	0	0	0	0
II/3, 4, 7 bacilli.	II	+	+++±	++	±	0
	II/3, 4, 7	++	++++	++++	+	±

the pattern of specificity is again in all respects identical with that of the agglutination reactions (table IV). This fact further

TABLE IV. — Precipitin Reactions of the Somatic Antigens of Phase II *Sh. sonnei* and of the Phage-resistant Variant II/3, 4, 7 in Anti-antigen Immune Sera.

SERUM of rabbit immunized with	SOMATIC antigen tested	FINAL DILUTION OF ANTIGEN				
		1 : 2 000	1 : 10 000	1 : 50 000	1 : 250 000	1 : 1 250 000
II antigen	II	+++±	+++++	+++	+	±
	II/3, 4, 7	0	0	0	0	0
II/3, 4, 7 antigen.	II	++	+++±	++±	±	0
	II/3, 4, 7	+++++	+++++	++	+	±

supports the concept that it is indeed the lipomucoprotein complex

which endows each microorganism with its individual and distinctive specificity.

If one next investigates the two purified lipomucoproteins for their ability to inactivate the T phages, it is found that the antigen of the Phase II bacillus inhibits *in vitro* T₂, T₆, T₃, T₄ and T₇, or all those phages to which this microorganism is susceptible (table V). On the other hand, the antigen derived from

TABLE V. — **Antiviral Activity of the Somatic Antigen of Phase II *Sh. sonnei* and the Phage Resistant Mutant II/3, 4, 7.**

VIRUS TESTED	INHIBITED BY	
	Phase II Antigen	Mutant II/3, 4, 7 Antigen
T ₂	++++	++++
T ₆	++	±
T ₃	+++	0
T ₄	++++	0
T ₇	++++	0

++++ 50 p. 100 inactivation of virus by 1 µgm antigen; 0, No inactivation.

the phage-resistant variant inactivates T₂, and, in higher concentrations, T₆. It fails in any concentration to inhibit T₃, T₄ and T₇. Just as the variant, II/3, 4, 7, is immune to attack by these three viruses, so does its antigen fail to inactivate them *in vitro*.

It has already been suggested that the reason for these differences in biological specificity of the two antigens undoubtedly resides in their different chemical make-up. A detailed study has, therefore, been made of the lipocarbohydrate component of each antigen, for it is this particular constituent which orients the immunological specificity of each, and which determines their antiviral properties, at least in so far as T₃, T₄ and T₇ are concerned. Enzymatic degradation of the two antigens with Pancreatin removes the major portion of the protein moiety of the antigens and greatly enhances their serological and antiviral activities. In each instance a residual fragment of the protein component can finally be eliminated by dissolving the substances in 90 per cent phenol, followed by dialysis, to yield the respective lipocarbohydrates. In the case of the lipocarbohydrate derived from the Phase II bacillus, this complex still retains its ability to inhibit T₃, T₄ and T₇, but has lost its capacity to inhibit T₂ and T₆. From this it is apparent that the antiviral activity of the native antigen is dependent upon the presence of

at least two specific structures within the molecule, and which show different stability toward chemical agents; whereas the antiviral activity toward T_3 , T_4 and T_7 is but little impaired by phenol treatment, that against T_2 and T_6 is completely destroyed. Thus it appears that the inactivation of the T_3 , T_4 and T_7 viruses is a function of the lipocarbohydrate moiety of the antigen. The presence of the residual protein component in the enzymatically degraded antigen seems to be essential for the inactivation of T_2 and T_6 . It can not yet be stated with certainty, however, that it is this constituent *per se* which is responsible for the inactivation of these two viruses *in vitro*, because the protein isolated after phenol dissociation is without antiviral activity. As one might anticipate, the lipocarbohydrate derived from the variant antigen by similar means, though still retaining its immunological activity, is also without antiviral properties.

An examination of the analytical constants of these two substances indicates that they are quite different. The lipocarbohydrate of the Phase II antigen contains some 2.8 per cent of nitrogen, 3.9 per cent phosphorus, 29 per cent of lipid, and on hydrolysis yields some 30 per cent of reducing sugars calculated as glucose. The percentages of these 4 constituents found in the lipocarbohydrate derived from the antigen of the variant II/3, 4, 7, are 2.0, 2.4, 50 and 10 per cent, respectively. The most sharply defined chemical differences exhibited by these two substances lie in the composition of their carbohydrate moieties.

Chromatographic analyses have revealed that the sugars which constitute the carbohydrate of the Phase II lipocarbohydrate are glucose, galactose and glucosamine. The identity of these sugars has also been confirmed by spectrophotometric analyses, employing methods recently devised by Dische. In addition, a fourth sugar has also been detected by this method, and has tentatively been identified as an aldohexose, probably galactohexose. It can be seen from the chromatogram that galactohexose and galactose migrate at very similar rates. It was possible, to identify both these sugars in the hydrolysates of the lipocarbohydrate by cutting sections of the chromatogram and analyzing each eluate spectroscopically. Thus it was found that the unknown sugar migrated at a rate very similar to that of galactohexose, and it has therefore been assumed that this sugar is present in the lipocarbohydrate of the Phase II antigen. On the basis of spectrophotographic data it is possible to estimate approximately the quantities of these sugars and that they occur in the molecular ratio of 1:1:1:2. The carbohydrate of the variant antigen, on the other hand, appears to contain but one sugar, a hexosamine, the migration rate of which differs from that of

glucosamine and chondrosamine and which has not yet been fully characterized.

In conclusion, it can be seen from the data presented that the lipocarbohydrate of the somatic antigen of Phase II *Sh. sonnei* differs very decidedly from that of the phage-resistant variant II/3, 4, 7. It is this difference which, in our opinion, determines the differences in serological specificity and in antiviral activity, in so far as T_3 , T_4 and T_7 are concerned, which each antigen exhibits. It is suggested that, in the case of Phase II *Sh. sonnei*, variation from phage susceptibility to phage resistance does not necessarily involve an inability to synthesize a lipomucoprotein complex. It seems more probable that this change is accompanied by changes in certain enzyme systems which are responsible for the elaboration of the carbohydrate portion of the antigen.

THE RATE OF INACTIVATION OF BACTERIOPHAGE T4R IN SPECIFIC ANTI-SERUM

I. — SALT EFFECT

II. — COFACTOR

by N. K. JERNE and LIS SKOVSTED.

(From the Department of Biological Standards,
Statens Seruminstitut, Copenhagen.)

Previous studies of the interaction between bacterial virus and specific serum [4-10], have established a number of facts concerning the union of antibody molecules with phage particles, the reversibility of this union, the rate of the reaction, and the influence of temperature and pH. We shall briefly state some main points :

Union of virus and antibody. — Several thousand antibody molecules can become attached to one phage particle. This probably means a close coating of the phage surface area. A small part of this area may be termed « the crucial site ». When the crucial site is occupied by one antibody molecule (perhaps by two or three molecules), the phage is inactivated : it cannot multiply. Possibly, the crucial site differs antigenically from the rest of the phage surface, so that the serum may contain, among its specific antiphage molecules, a fraction of « crucial » antiphage molecules. Phage particles that are adsorbed onto a bacterial host cell can no longer be inactivated by serum. Digestion with papain [8] and treatment with sonic-vibration [10] can restore the activity of phage particles inactivated by serum.

Reversibility. — All recent papers state that the union of antibody and phage is irreversible. Hershey [7] lists six different types of observation, all showing that the phage-antiphage reaction is irreversible under practical conditions of study. Andrewes [4], however, with one particular serum, obtained reactivation of inactivated phage particles by dilution of phage-serum mixtures. The present authors have not been able to demonstrate reversibility.

The rate of inactivation of bacteriophage in a mixture of phage and serum is the rate of attachment of antibody molecules to unoccupied crucial sites. The rate of inactivation is proportional to the concentration of the serum. The fraction f of virus particles remaining

active t minutes after having been mixed with specific serum may be given by the following relation

$$f = e^{-ktd}$$

in which D represents the dilution of the serum. In a plot relating $\log f$ on the ordinate to t on the abscissa, this formula is represented by a straight line with the slope kD . When diluting the serum and the suspension of virus particles in nutrient broth or saline, a good serum may show a rate constant k of about 1 000 per min., at 37° C. Experimental inactivation curves often follow a straight line only until f has gone below 1 p. 100. The rate of inactivation may then decrease and the curve bend off. The explanation of this tailing off still remains uncertain.

Temperature and pH. — In a medium containing electrolytes, Kalmanson, Hershey and Bronfenbrenner [4] found that the rate of inactivation was little affected by changes in pH within the range between pH 5.0 and 10.0. They also found inactivation to be 12 to 14 times faster at 37° than at 0° C, corresponding to a Q_{10} of about 2.

In the present paper we wish to report on the influence of the medium on the inactivation of bacteriophage by antiphage serum. A preliminary note was published in Nature [41]. The phage-antiphage system is particularly well suited for measuring variations in the initial rate of an immunological reaction, because we can make inactivation proceed at a measurable rate by lowering the concentrations. In other systems this procedure is limited by the lowest concentrations of the antigen that can be measured (for instance, 10^9 diphtheria toxin molecules per ml is the lowest concentration which can be demonstrated by the most sensitive skin test), whereas with phage every surviving particle can be made to show up.

MATERIALS.

Bacteriophage T4r was used in all experiments. Our phage stock was prepared as follows: 20 minutes after multiple infection of a 250 ml broth culture of coli strain B/1 with T4r phage 13 ml anti-B/1 serum were added. After lysis and low speed centrifugation the supernatant was centrifuged at high speed. The pellet was resuspended in M/100 NaCl and recentrifuged three times. The final suspension in M/100 NaCl was centrifuged at low speed and the supernatant was distributed into 1 ml ampoules and placed at 56° C for 45 minutes. These ampoules were then kept at 4° C. They contained about 1.3×10^{11} infective T4r particles per ml by plaque count. Dilutions of this stock suspension 1/20 000 in distilled water were kept at 4° C and used for most experiments. In these diluted suspensions the plaque counts decreased with time, corresponding to a half life of about 2 months.

The specific serum used in all experiments described was a pooled rabbit anti-T4r serum from two rabbits immunized with a T4r phage

suspension in saline. With intervals of three days the rabbits had received ten subcutaneous injections of 2 ml containing about 10^{11} particles/ml. One month after the last of these injections, the rabbits were given five intravenous injections, at three days intervals, of 1 ml containing about 10^{12} particles. After a two weeks rest they received two intravenous injections of 10^{12} particles separated by one week. Two similar injections were given six weeks later. Two weeks after the last dose, we drew about 40 ml blood from each rabbit by heart puncture. After spontaneous coagulation the serum was collected and stored at -10°C . Six months later this serum was distributed into ampoules, 0.2 ml in each, and again frozen. A fresh ampoule was broken on each experimental day. Table II shows that this serum yielded a k -value of $> 2\,000$ in a buffered saline diluent.

For most platings 0.1 ml samples were mixed into 2.5 ml fluid 0.6 p. 100 broth agar, kept at 45°C , to which five drops of a 24 hours culture of coli strain B/1 had been added immediately before. This total mixture was then plated on a 1 p. 100 broth agar bottom layer.

I. — SALT EFFECT.

The presence of salt greatly affects the rate of inactivation of phage in anti-phage serum. The salt effect was measured in one liter mixtures of T4r phage and anti-T4r rabbit serum, both diluted in redistilled water or water containing the requisite concentration of salt. The mixtures were prepared by placing a small volume (1 ml or less) of a serum dilution on the bottom of a large flask, and a similar volume of diluted phage suspension on the bottom of a second flask. One liter diluent of 36°C or 2°C was poured into the first flask and then transferred immediately into the second flask, at zero time.

The results of the determinations of k in mixtures containing various concentrations of NaCl are pictured in figure 1. It will be seen that the rate of inactivation is increased by a factor of about 1 000 when going from 1.0 n NaCl to 0.001 n NaCl. The steepest rise occurs from 0.1 n NaCl ($k = 4\,000$) to 0.01 n NaCl ($k = 200\,000$).

All measurements leading to k -values exceeding 20 000 were made in dilutions of specific serum 1:500 000. Therefore, at 10^{-3} normal and lower salt concentrations we had to make rapid measurements using large open flasks from which 0.05 ml drops were transferred directly to a plate and suffused with 2.5 ml liquid agar containing the coli. Table I shows an example of a rapid experiment. Higher concentrations of specific serum were necessary for determinations of k -values lower than 20 000.

Figure 1 shows that in our experiments in 1.0 n NaCl the rate of inactivation went down about ten-fold when lowering the temperature from 36°C to 3°C . This represents a Q_{10} of about 2. In the absence of salt, the corresponding decrease in rate of

TABLE I. — Rate of inactivation of phage T4r by specific serum in distilled water at 36° C and 3° C, in large volumes.

Volume.	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml
Temperature.	36° C	3° C	36° C
pH.	6,4	6,4	6,2
Anti-T4r serum.	1/500 000	1/500 000	0
Unspecific serum.	0	0	1/500 000
Diluent.	Redistilled water	Redistilled water.	Redistilled water.
T4r particles.	About 8 000/ml.	About 8 000/ml.	About 8 000/ml.

0,05 ML SAMPLES plated after	PLAQUE COUNTS	PLAQUE COUNTS	PLAQUE COUNTS
16 seconds.	169	275	
20 —	147	327	
25 —	102	233	
32 —	101	175	445
40 —	54	137	
50 —	25	122	
64 —	18	62	
80 —	21	87	
100 —	6	51	399
125 —	2	37	
160 —	5	20	
200 —	4	12	
250 —	0	9	
320 —	0	3	
400 —	0	1	460
k-values.	1 500 000	550 000	Control.

Table I shows the high k -values obtained in the absence of salt. The decrease in reaction velocity when lowering the temperature from 36° C to 3° C is about 3-fold, corresponding to a Q_{10} of about 1,3.

inactivation was only about three-fold, which means a Q_{10} of about 1.4. If the rate of inactivation reflects the rate of attachment of antibody molecules to crucial sites on the phages, and if this rate were proportional to the frequency of random collisions between particles of phage and antibody, then we might expect a Q_{10} of about 1,4, because this is the supposed increase in collision frequency resulting from the greater velocity of the particles in the less viscous water of higher temperature. The high Q_{10} and the low rate of inactivation in 1.0 n NaCl indicate that only a fraction of less than 0,1 p. 100 of collisions is fruitful, and that this fraction decreases with decreasing temperature. The lower Q_{10} observed in the absence of salt may indicate that in distilled water a large fraction of collisions lead to a permanent union between phage and antibody.

In distilled water pH control is difficult. We varied pH by adding traces of HCl and NaOH, and found that the rate of inac-

tivation decreased markedly when pH was brought outside the range 4.8 to 7.2.

A large number of experiments were carried out with various concentrations of other salts in one liter mixtures of T4r and specific serum diluted 1:500 000. We found no appreciable differences among the rates of inactivation in solutions of the same normality of NaCl, Na₂SO₄, CuCl₂, MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂ and NiCl₂. There was no difference between redistilled water and

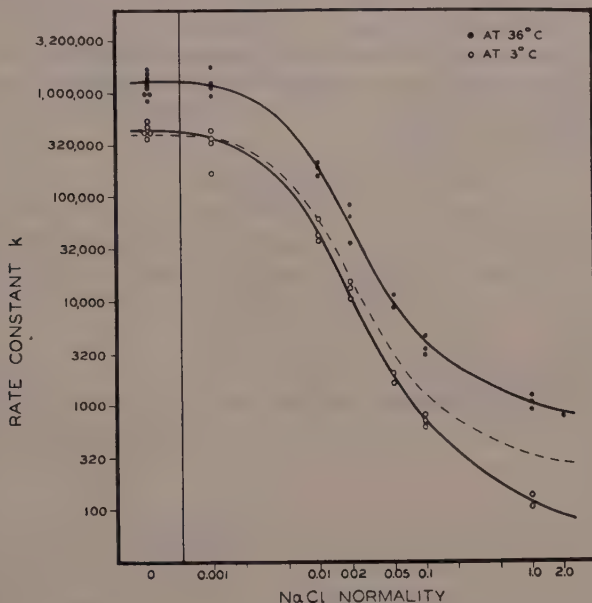


FIG. 1. — *The effect of NaCl on the rate of inactivation of bacteriophage T4r in anti-T4r serum.*

Figure 1 shows the curves relating the rate constant k to the salt concentration in the medium, at 36° C and at 3° C. The stippled curve is a hypothetical 3° C curve drawn below the 36° C curve assuming $Q_{10} = 1.4$. The measurements were carried out in one liter mixtures of phage and specific serum without adding cofactor.

10^{-4} normal or more dilute solutions of any of these ions (All k -values about 10^6 or higher). A slight reduction of the rate of inactivation could be noticed in 10^{-3} normal solutions, whereas 10^{-2} normal solutions gave an about ten-fold rate decrease. The effect of CuSO₄, AlCl₃ and FeCl₃ could not be investigated in such high concentrations because they inactivated T4r in the absence of serum. It was found, however, that concentrations of these ions, which could not by themselves inactivate

the phage ($10^{-4.5}$ n CuSO_4 , 10^{-5} n AlCl_3 and 10^{-6} n FeCl_3) did not affect the rate of inactivation by specific serum.

Among other substances tried we must mention arginine, lysine, glycine, tryptophane and glutaminic acid. These amino acids caused a minor decrease in the rate of inactivation in concentrations of 10 γ /ml and were highly inhibitive in 100 γ /ml concentrations. The same applies to 8-hydroxyquinoline. Remarkably inhibitive were lysozyme and protamine. Concentrations of only 1 γ /ml lysozyme and 0.1 γ /ml protamine sulphate in distilled water (about 10^{-7} molar) caused total inhibition of inactivation in one liter mixtures of T4r and specific serum diluted 1:500 000. They were thus much more potent inhibitors than any of the metal ions tried. The effect of these substances will be further discussed in the next section.

II. — COFACTOR.

We shall now describe some experiments which have led us to the conclusion that at least two serum components are involved in the inactivation of bacteriophage T4r: the specific antiphage globulin, and an unspecific protein cofactor.

TABLE II. — Rate of inactivation of phage T4r by specific serum in phosphate buffered saline.

Volume	10 ml					
Temperature	37°C					
pH	7.4					
Diluent	Phosphate buffered saline.					
T4r particles	About 3500/ml.					
Times of plating 0.1 ml samples (min.) . .	1	40	30	60	120	k-values
CONCENTRATIONS OF ANTI-T4 SERUM (in gamma/ml)						
1 250	43	0	0	0	0	2 600
630	64	0	0	0	0	2 700
320	154	0	0	0	0	2 500
160	188	5	0	0	0	2 760
80	277	42	0	0	0	2 600
40	350	147	14	0	0	2 700
20	350	231	89	26	0	2 300
10	350	288	169	107	24	2 200
5	350	333	273	206	85	2 200
2	350	325	290	306	207	
1	350	302	301	318	293	
0		366	326	347	377	Control.

Table 2 shows plaque counts from an experiment in 10 ml test tubes using buffered saline as diluent. The concentration of anti-T4 serum is given in gamma per ml. 1 gamma/ml is a dilution of serum 1/1 000 000.

Series of serum dilutions were prepared in 9 ml volumes in pyrex glass test tubes, and placed at 37° C. To each of these tubes were added 1 ml of a phage dilution containing about 35 000 T4r particles. At various times after mixing 0.1 samples were plated. We used the same rabbit anti-T4 serum as in the experiments of section I. Table II gives the results of an experiment in which both serum and phage were diluted in phosphate buffered saline, pH 7.4. The last column shows that the k -value is found to be about 2 500 per minute, practically independent of the degree of dilution.

The results of an experiment in which the same procedure was followed, except that both serum and phage were diluted in redistilled water, are given in table III. The k -value in this

TABLE III. — Rate of inactivation of phage T4r by specific serum in distilled water, in test tubes.

Volume	10 ml					
Temperature	37° C					
pH	6.1					
Diluent	Redistilled water.					
T4r particles	3 500/ml					
Times of plating 0.1 ml samples (min.)	1	40	30	60	120	k -values
<hr/>						
CONCENTRATION of anti-T4 serum (in gamma/ml)						
160	0	0	0	0	0	> 25 000
80	3	0	0	0	0	> 50 000
40	1	0	0	0	0	> 100 000
20	0	0	0	0	0	> 200 000
10	408	371	379	392	328	< 300
5	Ca.: 350	350	350	350	350	
2	350	350	350	350	350	
1	350	350	350	350	350	
0.32	350	350	350	350	350	
0.1	350	350	350	350	350	
0	350		345		350	Control.

Table III shows the high k -values obtained in distilled water, and the sudden inhibition of inactivation when diluting the specific serum more than 1/100 000.

diluent cannot so be determined: In serum diluted 1/50 000 inactivation of phage is complete within one minute ($k > 200 000$), but in serum diluted 1/100 000 or more no inactivation can be observed.

Repetitions of this experiment in distilled water medium always showed this sudden inhibition. The addition of a small amount of normal serum will remove the inhibitory effect and

allow inactivation to proceed in much higher dilutions of specific serum. Table IV shows the results of an experiment in which the same procedure as before was followed except that the specific serum and the phage were now diluted in distilled water containing a dilution 1/5 000 of normal rabbit serum. Even in specific serum diluted 1/10 000 000 inactivation can now be observed.

Before discussing these observations we must report the results of another set of experiments in which the procedure described in section I was used: The mixtures were made up in large flasks, by dumping one liter distilled water onto small volumes of diluted serum and phage. By this procedure, *k*-values exceeding one million can be measured in dilutions of specific

TABLE IV. — Rate of inactivation of phage T4r by specific serum in distilled water containing normal serum diluted 1/5000.

Volume	10 ml					
Temperature	37° C					
pH	6.4					
Diluent	Redistilled water.					
Cofactor	Normal rabbit serum 1/5 000					
T4r particles	About 4 000/ml.					
Times of plating 0.1 ml samples (min)	1	10	30	60	120	<i>k</i> -values.
CONCENTRATION of anti T4 serum (in gamma/ml)						
40	0	0	0	0	0	> 100 000
20	0	0	0	0	0	> 200 000
10	2	0	0	0	0	> 400 000
5	96	0	0	0	0	300 000
2	264	2	0	0	0	250 000
1	346	5	0	0	0	400 000
0.32	382	148	21	1	1	300 000
0.1	375	278	187	115	49	200 000
0.032	400	348	344	259	270	
0.01	400	405	400	367	316	
0		426			461	Control.

Table IV demonstrates the effect of adding diluted normal serum to the distilled water diluent. The inhibition shown in table III has been removed.

serum 1/1 000 000 in distilled water without adding normal serum or other substances. The results of such an experiment are given in table V. The procedure of dumping one liter of water onto small volumes of diluted serum and phage was practical, but not necessary, since results similar to those given in table V were obtained when the serum and phage dilutions were made up separately in 1/2 liter volumes and mixed.

TABLE V. — Rate of inactivation of phage T4r in large volumes of highly diluted specific serum in distilled water.

Volume	1 000 ml						
Temperature	21° C						
pH	6.2						
Diluent	Redistilled water.						
T4r particles	About 4 500/ml.						
Times of plating 0,1 ml samples (min.)	1	10	30	60	120	240	k-values
<hr/>							
CONCENTRATION of anti-T4 serum (in gamma/ml)							
<hr/>							
10.	0	0	0	0	0	0	> 500 000
3,2.	4	0	0	0	0	0	1 500 000
1.	125	5	0	0	0	0	1 300 000
0,32.	401	361	298	241	121	33	< 40 000
0,1.	423	467	416	495	405	331	< 40 000
0,032.	444	425	442	451	374	327	< 40 000
0.	432		405			372	Control.
<hr/>							
When adding cofactor (dried egg white, 1 gamma/ml):							
0,1.	486	184	30	4	1	0	1 000 000
0,032.	518	389	198	66	18	8	1 000 000
0.	469		503		443		Control.
<hr/>							
Table V shows that phage inactivation in distilled water medium in large volumes, without the addition of cofactor, proceeds rapidly in dilutions down to 1/1 000 000. In still higher dilutions there is again inhibition which can be prevented by adding a minute amount of dried egg white. Inactivation can then be demonstrated even in dilutions of specific serum 1/30 000 000.							

A comparison between tables III and V shows that the dilutions of specific serum below which inhibition occurs are less than 1:100 000 in 10 ml mixtures but more than 1:1 000 000 in 1 liter mixtures. We therefore thought that the glass wall might be engaged in the inhibition phenomenon. The glass-liquid interface in the 10 ml test tubes was about 2.5 cm²/ml, whereas it was about 0.5 cm²/ml in the 1 000 ml flasks. In a 0.2 ml pipette the glass-liquid interface is about 30 cm²/ml. Experiments such as the following showed that phage inactivation proceeding at a high rate was stopped in samples drawn into narrow pipettes. About 40 seconds after mixing 5×10^6 T4r particles with one liter of a 1/1 000 000 dilution of specific serum, a sample was drawn into a 0.2 ml pipette and left there. The plaque counts in 0.1 ml samples from the one liter mixture were 43 after 2 minutes and zero after 30 minutes. Plating 0.1 ml from the pipette after 30 minutes gave 125 plaques.

Phage inactivation in 1:500 000 dilutions of specific serum in

1 liter volumes could be entirely inhibited by putting broken glass into the test flasks.

Inhibition in test tubes could not be prevented by continuous shaking in a shaking machine. Nor did other materials than glass make any difference : Glass tubes coated with paraffin and with silicon, plastic tubes and tubes of stainless steel all gave results similar to those recorded in table III.

Though this result disposed of a specific adsorption on glass, and though adsorption must proceed rapidly to explain inhibition, we accepted the working hypothesis that an unspecific cofactor normally present in serum is adsorbed on the wall-liquid interface at a sufficiently high rate to cause inhibition of phage inactivation. This serum component cannot be the specific antiphage globulin itself : 30 minutes after mixing 35 000 T4r particles into 10 ml specific serum diluted one to a million in distilled water, half this mixture was poured into a second test tube containing 0.1 ml of a 1:100 dilution of normal serum. Again 30 minutes later 0.1 ml samples were plated. Plaque counts : first test tube 327, second test tube zero. Therefore, specific antiphage was present also in the second test tube. The normal serum must have provided some cofactor, missing in the first test tube.

Antiphage does not seem to combine with phage prior to the action of cofactor : A 10 ml mixture of 10^5 T4r per ml and specific serum diluted one to a million in distilled water was left for 30 minutes. Samples were then diluted 1:100 in a dilution 1:5 000 of normal serum. No phage inactivation occurred, whereas the addition of 0.1 ml of a dilution 1:50 of normal serum to the original mixture initiated rapid inactivation.

The nature of the cofactor was investigated by the following experimental procedure. Mixtures were prepared in test tubes by adding 1 ml phage suspension containing about 40 000 T4r particles to 9 ml specific serum diluted one to a million in redistilled water. No inactivation occurs in such mixtures (table III), whereas the addition of cofactor makes inactivation proceed rapidly (table IV). Dilutions of the substances to be investigated were added to the serum dilution before adding phage. Zero or low plaque counts in 0.1 ml samples plated one hour after mixing were taken to indicate cofactor activity. Table VI shows an example of these experiments. Controls were always included to show that no inactivation occurred when either the specific factor or the cofactor were left out.

The experimental procedure did not permit a clear demarcation of the limiting concentrations. Lysozyme, for instance, always showed full activity in a concentration of 1 γ /ml under the given experimental conditions. In a concentration of 0.1 γ /ml it was usually equally effective, but now and then it unexpectedly failed.

TABLE VI. — Cofactor activity of protamine sulphate and dried egg white.

Volume	10 ml								
Temperature	37° C								
T4r particles	About 3 000/ml.								
Anti-T4r serum	1/1 000 000								
Diluent	Redistilled water, containing protamine or dried egg white.								
Time of plating.	60 minutes after mixing.								

CONCENTRATION of cofactor (in gamma/ml)	PLAQUE COUNTS								pH
Protamine sulphate :									
100	199	142	133	226					4,3
10	194	260	243	218	248	188	175	81	5,9
1	240	193	109	148	212	0	110	3	6,3
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	6,2
0,01	0	0	290	288	0	113	0	274	6,0
0,001	305	227	317	321					6,1
Dried egg white :									
10 000	247	228	225	205					6,2
1 000	0	0	1	0					6,5
100	0	0	0	0	0	1	0	0	6,3
10	1	0	0	0	0	0	0	0	6,2
1	0	0	2	0					6,3
0,1	300	326	303	288					6,3

Table VI shows the cofactor activity of various concentrations of protamine and egg white. Every plaque count represents a different mixture. Variable results when using 0,01 gamma m/l and 1,0 gamma/ml of protamine sulphate show the difficulties in determining the limiting concentrations. Controls in which either the specific serum, or cofactor, or both, were left out showed no inactivation.

whereas, in a concentration of 0.01 γ /ml it usually, but not always failed. So as not to be led too far astray by lack of strict reproducibility we always prepared several identical mixtures of every composition, and repeated them on different days. The experiments thus became very extensive, and we must confine ourselves to the following points summarizing the results. First, we tried to narrow down the serum fraction containing the cofactor. Later, we looked for cofactor activity in other substances.

1° Normal sera and immune sera from rabbit, horse, ox and man contain the cofactor. Under the experimental conditions given they were all active in concentrations ranging from 20 to 1 000 γ /ml.

2° The cofactor is not destroyed by boiling a serum for one hour in any dilution with distilled water.

3° The cofactor is not entirely destroyed by boiling a serum for 10 minutes in n HCl. After neutralization with NaOH a dilution containing 100 γ serum per ml was fully active.

4° The cofactor is rapidly destroyed by boiling a serum with n NaOH.

5° After fractionation of a serum into two globulin fractions, an albumin fraction, and a non-protein fraction, by precipitation with 30 p. 100 saturated, 50 p. 100 saturated, and fully saturated ammonium sulphate respectively, the cofactor was found in both globulin fractions. The albumin fraction appeared to contain far less than 10 p. 100 of the total cofactor, and no activity could be demonstrated in the non-protein supernatant. The precipitates were redissolved in distilled water, and the ammonium sulphate was removed by repeated dialysis against distilled water. Euglobulin precipitating inside the dialysis bag was removed by centrifugation. A solution of the total pseudoglobulin fraction in distilled water, brought to the same volume as the serum from which it was obtained, could be further diluted 1/100 000 and still show full cofactor activity.

6° Electrophoretic fractionation of normal rabbit serum in a fluoride-phosphate buffer at pH 7.68, showed the cofactor moving with the α I, α II, β and γ globulins. The highest cofactor activity was found in the two fractions containing α II globulin (albumin + α I + α II, and ϵ + γ , + β + α II). The albumin fraction showed no appreciable activity.

7° The cofactor could not be dialysed from any of the above fractions, or from dilutions of whole sera, neither before nor after boiling in distilled water.

8° The cofactor could be obtained from serum in a dialysable form by heating serum diluted 1:10 in acetate buffer of pH 4.7 for 10 minutes at 100° C. By this treatment practically all proteins are precipitated. However, after centrifugation a high concentration of cofactor could be demonstrated in the supernatant. It was now freely dialysable against distilled water. The small precipitate obtained by half saturation of this supernatant with ammonium sulphate at pH 10, when redissolved in distilled water and brought to the same volume as the original serum, showed cofactor activity even in a further dilution 1:10 000.

9° No cofactor activity was found in serum lipoid extracts, or other non-protein serum constituents.

10° Dry commercial peptone (« Orthana » peptone = pepsin digested hog meat) showed cofactor activity in dilutions ranging from 50 to 2 000 γ /ml. From such dilutions the cofactor was dialysable.

11° Dried egg white in concentrations ranging from 1 to 1 000 γ /ml showed full cofactor activity (see table VI).

12° Crystalline lysozyme, prepared from egg white, was active in concentrations ranging from 0.05 to 5 γ /ml. It was equally active after boiling for 15 minutes in acetate buffer of pH 4.7, and was dialysable against distilled water. The cofactor activity was rapidly destroyed by boiling at pH 11.

13° Human tears showed cofactor activity in dilutions down to 1:100 000. Tears contain about 1 mg lysozyme per ml.

14° Commercial papain was active in a concentration of 1 γ /ml. (Contains a large fraction of plant lysozyme.)

15° Protamine sulphate (« Roche ») showed cofactor activity in a 0.1 γ /ml concentration. Sometimes 0.01 γ /ml was found to be sufficient. Concentrations of 1 γ /ml and higher were inhibitive (see table VI).

16° Arginine and lysine were a few times found to be active in concentrations around 0.1 γ /ml. These observations could not be reproduced, however. No cofactor effect was obtained with tyrosine and tryptophane.

17° 8-hydroxyquinoline showed no cofactor activity.

TABLE VII. — Cofactor-salt interaction.

Volume	10 ml
Temperature	37° C
T4r particles	About 3 000/ml.
Anti-T4r serum.	A, 1/1 000 000; B, 1/100 000.
Diluent.	Various concentrations of NaCl and of protamine sulphate in distilled water.
Time of plating	2 hours after mixing.

CONCENTRATION of protamine sulphate (in gamma/ml)	NaCl NORMALITY :							
	0,0001	0,001	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	
A {	0	266	317	139	172	334	301	273
	0,1	0	0	10	4	236	345	296
	1	84	5	0	7	90	232	258
	10	194	45	6	7	13	75	147
B {	0	307	109	132	12	1	3	32
	0,1	0	0	0	0	0	11	63
	1	0	2	0	0	0	0	17
	10	1	0	0	0	0	6	9

Table VII shows plaque counts from mixtures of phage and antiphage in various concentrations of NaCl and protamine sulphate. Small concentrations of salt seem to reduce the inhibition due to cofactor adsorption on glass and to cofactor excess. Addition of cofactor reduces inhibition due to salt.

Under the experimental conditions given (phage, cofactor, and specific serum diluted one to a million in distilled water, in 10 ml

test tubes) the range of concentrations of the different substances showing cofactor activity is widest for egg white (1 to 1 000 γ /ml), less wide for serum (20 to 1 000 γ /ml), peptone (50 to 2 000 γ /ml) and lysozyme (0.05 to 5 γ /ml), and very narrow for protamine sulphate (around 0.1 γ /ml). It is interesting to note that the concentrations of lysozyme and protamine, which can remove inhibition of phage-inactivation in 10 ml test tubes, are sufficient to inhibit inactivation in one liter mixtures. This enabled the following experiment: We prepared a one liter mixture of phage and serum diluted 1:500 000 in distilled water containing 0.1 γ protamine sulphate per ml, and poured 10 ml quantities from this mixture into a few test tubes. Plaque counts showed that no inactivation was observable in the large volume mixture, whereas rapid inactivation took place in the test tubes.

There appeared to be interaction between cofactor and salt, such that the inhibitive action of one of these two could to a certain extent be counterbalanced by small concentrations of the other. This is indicated by the results of a few experiments, given in table VII, in which protamine sulphate was added to specific serum diluted in redistilled water and mixed with T4r phage suspended in dilutions of NaCl.

DISCUSSION.

It has been shown that the rate of inactivation of bacteriophage T4r by specific serum is highly dependent on the diluent. The highest rate is obtained in distilled water. However, in distilled water in test tubes we observe inhibition of inactivation in dilutions of specific serum exceeding 1:100 000. This inhibition can be removed by adding minute amounts of normal serum or of substances like lysozyme or protamine. The action of these substances may be 1° either to neutralize an inhibitive factor, or 2° replace a serum component necessary for inactivation.

1° If an inhibitive substance is present, it must come from the phage suspension, the serum, the distilled water or the wall of the vessel. The phage suspension was a repeatedly washed suspension in M/100 NaCl, holding more than 10^{11} infective particles per ml. In the phage serum mixtures this suspension was present in dilutions ranging from 10^{-5} to 10^{-8} . Since this would represent an enormous dilution of a postulated inhibitive factor, and since inhibition did not depend on the degree of dilution within this range, we think this source can be ruled out. The serum itself may contain an inhibitive factor which is neutralized by another serum factor, and becomes inhibitive only in high dilutions. This would require the postulation of two opposed unspecific serum factors, for which we have no evidence. The

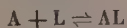
remaining sources of an inhibitive factor are the distilled water and the walls of the test tubes. The water was always redistilled in an all pyrex glass apparatus, and the test tubes were also pyrex glass and always carefully rinsed in boiling distilled water. The distilled water and the glass may be responsible for very minute concentrations of metal ions, and it has been suggested that the power of protamine and other such substances to remove inhibition may be due to a chelating mechanism, i. e. a removal of toxic metal ions. However, we have shown that a large number of metal ions are not inhibitive in concentrations far exceeding the traces which may come with the redistilled water or from the wall of the test tubes.

Salts of Na, Ca, Mg, Mn, Co and Ni showed almost no effect on the inactivation rate in concentrations as high as 10^{-3} normal, and acted practically alike at higher concentrations. The impurities contained in these salts have therefore shown no inhibitory action. Moreover, a chelating substance like 8-hydroxyquinoline could not remove the inhibition.

2° We have therefore concluded that the action of the protamine-like substances is to replace a serum component necessary for phage inactivation and that the inactivation of T4r by specific antibody requires the presence of a cofactor. Around pH 6 both the phage and the specific anti-phage globulin molecules are negatively charged, and a positively charged molecule like protamine may be needed to bring the two particles together. All substances showing cofactor action had a high isoelectric point. Normal sera, and specific serum, were shown to contain a protein of high cofactor activity, that was not destroyed by boiling at low pH, a procedure which removes all acidic proteins. Protamine is known to combine with virus. (We have found that visible flocculation occurs in suspensions of 10^{12} T4r/ml in distilled water when protamine or lysozyme to a concentration of 100 γ /ml or more is added.) Protamine is also known to combine with serum globulins. (Precipitation occurs when protamine or lysozyme in concentrations well below 100 γ /ml are added to serum diluted 1:5.) Moreover virus-albumin-protamine complexes are well known. Salt acts by dissociating all such complexes.

We therefore suggest the following mechanism :

A lysozymelike or protaminelike substance in serum is a normal cofactor for the specific union of phage and antiphage, by facilitating their approach or by liberating specific groups which have to unite. In specific serum we may have an equilibrium between antiphage molecules (A) and cofactor molecules (L)



of which only the form AL is capable of inactivating phage.

Dilution, and the addition of salt, will promote dissociation of AL. Since the association constant is probably high, simple dilution in water may first increase the AL concentration, because of the decrease in salt. In dilutions of the order of 1:100 000 or 1:1 000 000 and more, the dissociation of L from AL may become appreciable. Our experiments have shown that inhibition of inactivation in distilled water depends on the surface/volume ratio, and we have shown that the specific antiphage globulin remains in the mixture. The number of protein molecules which can find room in a monolayer on the wall of a test tube is of a reasonable order of magnitude to become important in dilutions of serum 1:100 000. We therefore think that adsorption of cofactor at the wall-liquid interface removes appreciable quantities of L, and causes further dissociation of AL. Addition of a substance that can act as cofactor will replace L and increase the concentration of AL.

The salt effect may be partly due to dissociation of AL by salt. The inhibition caused by salt is therefore, to some extent, reversed by adding more L. On the other hand, the addition of an excess of L causes total inhibition of inactivation, possibly by occupying too many sites on A (and on phage). What is then needed to obtain phage inactivation is a certain degree of dissociation. This, as we have seen, can be brought about by adding a little salt. Salt also reduces the inhibition observed in 10 ml test tubes probably by making more L available by dissociation of L from the glass-liquid interface.

Unspecific protein, by combining reversibly with L, may also prevent cofactor excess in becoming inhibitory. This may explain why a substance like egg white shows a wider range of active concentrations than purer substances like lysozyme or protamine.

We have repeated the main experiments described in this paper with an anti-T4r horse serum of high potency. All results were similar to those obtained with rabbit serum. Freeze-dried 3 ml quantities of this horse serum are available to everybody interested.

ACKNOWLEDGMENT.

We are indebted to Mr. Vagn Möller for many helpful discussions and for the preparation and specific determination of lysozyme. We also wish to thank Mr. A. Birch-Andersen for the electrophoretic fractionation of some of our sera.

SUMMARY.

1° The rate of inactivation of bacteriophage T4r in anti-T4r serum is increased by a factor of about 1 000 when decreasing

the salt concentration of the medium from 1 n to 0.001 n. In the latter salt concentration and in distilled water k -values exceeding 10^6 were measured.

2° The temperature coefficient of the inactivation process in distilled water corresponds to a Q_{10} of about 1.4.

3° The optimum pH range under these conditions is about 4.8-7.2.

4° At least two serum components are involved in the inactivation of bacteriophage T4r: The specific antiphage globulin, and an unspecific globulin cofactor showing physical properties similar to lysozyme.

5° In high dilutions of serum, dissociation of the cofactor from specific antiphage, and adsorption of cofactor on the wall of the test vessel can prevent inactivation of phage.

6° Inactivation can then be made to proceed by adding a substance capable of replacing the cofactor.

7° Such substances are: serum, peptone, egg white, lysozyme and protamine.

8° Lysozyme and protamine act as cofactor in concentrations of about 0.1 γ per ml, or about 10^{13} molecules per ml, under the given experimental conditions.

9° Cofactor excess causes inhibition of phage inactivation.

10° Salt reduces the inhibitory effect of cofactor excess, and *vice versa*.

REFERENCES

- [1] C. H. ANDREWES and W. J. ELFORD. *Brit. J. exp. Path.*, 1933, **14**, 367.
- [2] F. M. BURNET, E. V. KEOGH and D. LUSH. *Austral. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 1937, **15**, 227.
- [3] A. D. HERSHEY. *J. Immunol.*, 1941, **41**, 299.
- [4] G. M. KALMANSON, A. D. HERSHEY and J. BRONFENBRENNER. *J. Immunol.*, 1942, **45**, 1.
- [5] A. D. HERSHEY, G. M. KALMANSON and J. BRONFENBRENNER. *J. Immunol.*, 1943, **46**, 267.
- [6] A. D. HERSHEY. *J. Immunol.*, 1943, **46**, 281.
- [7] A. D. HERSHEY. *J. Immunol.*, 1943, **47**, 77.
- [8] G. M. KALMANSON and J. BRONFENBRENNER. *J. Immunol.*, 1943, **47**, 387.
- [9] M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1945, **50**, 137.
- [10] T. F. ANDERSON and A. H. DOERMANN. *J. Bact.*, 1952, **63**, 291.
- [11] N. K. JERNE. *Nature*, 1952, **169**, 117.

THE FATE OF THE INFECTING PHAGE PARTICLE (1)

by A. F. GRAHAM.

(Connaught Medical Research Laboratories,
University of Toronto, Toronto, Canada.)

During the past three years our bacteriophage studies have been concerned with the nature of the changes undergone by the infecting virus particle. This problem has been approached from two directions. We wished to investigate, firstly, the breakdown of the infecting particle and, secondly, the appearance of parental phage phosphorus in the virus progeny. The main concern here is to summarize some of the recent results. These will be published shortly with full experimental details.

Materials and methods. — The work has been carried out exclusively with the seven T phages active on the host *E. coli* B. These phages have been labelled with P^{32} and purified as previously described [1]. Breakdown of the infecting phage was determined by measuring the fraction of P^{32} converted to a form soluble in 5 p. 100 trichloroacetic acid (TCA) [2, 3]. A further measure of breakdown was obtained by centrifuging the infected cells for 15 minutes at 5 000 *g* and determining the percentage P^{32} left in the supernatant. This fraction is referred to as « non-sedimentable P^{32} ». The transfer of parental P^{32} to progeny has been determined by a method similar in principle to that of Putnam and Kozloff [4].

Breakdown of the T phages on infection of the host. — When the host is singly infected with labelled T2r+ the formation of extra-cellular products of breakdown is illustrated by curves 1 and 2, figure 1. If the cell is first infected with unlabelled T2r+ and 5 minutes later labelled T2r+ is adsorbed there is extensive degradation of the latter as shown in curves 3 and 4, figure 1. The primary infection thus stimulates the cell to break down superinfecting T2r+. Since this effect may be of importance as an explanation for mutual exclusion as suggested by Weigle and Delbrück [5] and Dulbecco [6] similar experiments have been

(1) This work was aided by grants from the National Cancer Institute of Canada, and was carried out by Dr R. C. French, Mr. S. M. Lesley, Dr C. E. van Rooyen and the author.

carried out with other labelled phages. The results may be summarized as follows.

1° Primary infection with r^+ or r even numbered T phages, or T5, stimulates the breakdown of superinfecting r^+ phages as shown in figure 1.

2° When both primary and secondary « infection » are carried out with ultra-violet killed T2r+ the « superinfecting » phage releases about 30 p. 100 TCA soluble P^{32} .

3° Single infection by r phages gives breakdown curves as for

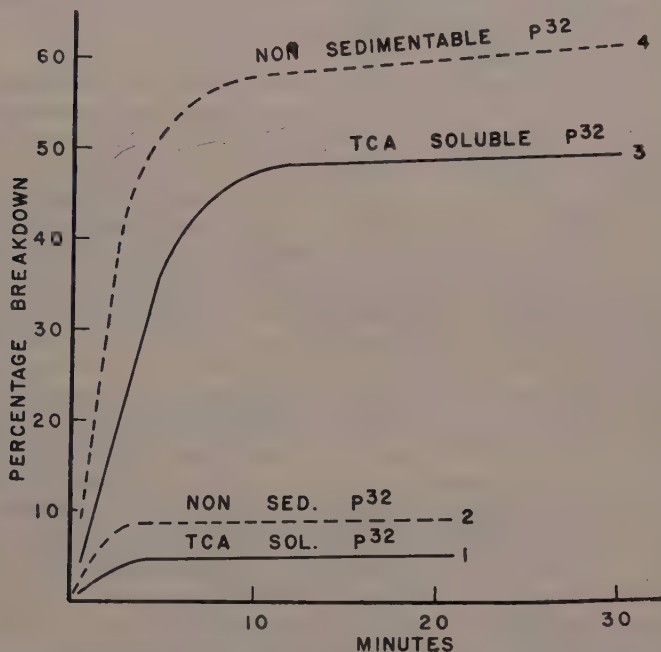


FIG. 1. — Breakdown of T2r+ phage after infection. Curves 1 and 2, TCA soluble and non sedimentable P^{32} in single infection. Curves 3 and 4, TCA soluble and non sedimentable P^{32} from superinfecting phage.

r^+ . Primary infection with r^+ or r phages causes an increased breakdown of superinfecting r (30 p. 100) but this breakdown is not as extensive as with r^+ .

4° Primary infection with T1, T3 or T7 stimulates no increased breakdown of superinfecting T2r+ or of T2r.

5° Single infection breakdown of T7 is less than 15 p. 100 at the end of the latent period and this is not increased by previous infection of the cells with T2r+, T2r or T7. While the experiments are not nearly as extensive the behaviour of T1 is similar to that of T7.

Thus the superinfection breakdown phenomenon is confined to those instances where primary infection is with an even numbered T phage or T5 and secondary infection is with an even numbered phage. For technical reasons no experiments have yet been carried out with superinfecting T5.

In the following sections are described some further observations on the nature of superinfection breakdown. Here we are concerned only with the formation of TCA soluble products since this is the most clear cut measure of breakdown. Numerous observations have also been made on the release of non-sedimentable P^{32} under different experimental conditions but these will be described elsewhere.

Penetration of the cell by T2 phage DNA. — The separation of T2 phage into protein and desoxyribonucleic acid (DNA) fractions by Herriott [7] made it possible to determine which moiety was responsible for superinfection breakdown. Adsorption of T2 protein « ghosts » to the cell did not induce breakdown of the superinfecting T2 although genetic exclusion of live T2 was almost complete one minute after adsorption of the ghosts. Ability to induce superinfection breakdown is therefore a property of the phage DNA. It is probable that this DNA penetrates into the cell immediately after adsorption as is shown by the following experiments.

There was little or no action by desoxyribonuclease (DNase) on labelled T2r+ phage. After adsorption to heat killed cells up to 60 p. 100 of the P^{32} could be digested to a TCA soluble form by DNase. DNase added to a culture of live cells singly infected with T2 released only a negligible quantity of TCA soluble P^{32} . This suggests that one of the first steps in T2 infection is a release of DNA from its protective protein covering into the interior of the cell. Hershey and Chase [8] have come to a similar conclusion from more extensive experiments with P^{32} and S^{35} labelled T2 phage.

Since T1 and T7 do not stimulate the breakdown of T2 it was of interest to determine the action of DNase after superinfection with T2. No action was apparent. Nor did DNase increase the amount of TCA soluble P^{32} formed after adsorption of T2 to T2 infected cells. Perhaps that portion of the superinfecting T2 not released as breakdown products is inside the cell.

The effect of inhibitors and irradiation on superinfection breakdown of T2r+. — Anderson [9] has shown that phage can multiply in cells killed with ultra-violet radiation. It has been found here that cells irradiated to 10^{-1} p. 100 survival and infected with T2r+ induced the full breakdown effect for superinfecting T2. There was a normal yield of new phage. Further, cells first infected with T2r+ and then irradiated to $10^{-2.5}$ sur-

vival of infective centres still broke down superinfecting phage to the extent of 50 p. 100. The full stimulation breakdown effect can thus be induced in non-viable cells and when induced in viable cells does not require the survival of intracellular phage to operate to its full extent. It therefore appeared that the breakdown might result from the action of an intracellular enzyme activated by the initial infection. This supposition was supported by the following observations.

The addition of 0.05 M potassium cyanide to a cell culture prior to infection with T2r⁺, prevents the formation of TCA soluble P³² from superinfecting labelled phage adsorbed 5 minutes later. This concentration of cyanide added 5 minutes after primary infection does not prevent the formation of 50 p. 100 TCA soluble P³² from T2r⁺ adsorbed after a further 5 minutes. Cyanide thus prevents the breakdown mechanism from forming, but once it is formed has no inhibiting action on the breakdown of superinfecting phage.

Streptomycin (5 mg per ml) added before or after primary T2 infection prevents the breakdown of superinfecting T2r⁺. There is also no intracellular growth of phage in either case. If the cells are first adapted to growth in this concentration of streptomycin, normal T2 phage growth can occur in the presence of streptomycin. Still there is little breakdown of superinfecting T2. If, however, the adapted cells are infected in the presence of streptomycin centrifuged and resuspended in fresh broth with no streptomycin present, superinfecting T2 phage is now broken down to 35 to 40 p. 100.

These results led to the belief that a desoxyribonuclease might be present in the normal host and that primary infection with T2 reorganized this enzyme to a position in the cell where it could block the entry of a second T2 particle. The reorganization would still occur in streptomycin resistant cells but the enzyme could not act until the inhibiting streptomycin was removed. The following observations show that a desoxyribonuclease is normally present in the host.

Isolation from E. coli of an enzyme with the properties of a desoxyribonuclease. — Freshly grown cells were suspended in saline, cyanide was added to 0.003 M concentration followed by 100 T2r⁺ per cell. The culture was fully lysed in 6 minutes. The lysate was tested for DNase activity by measuring the TCA soluble P³² released from a heat killed preparation of T2r⁺. Powerful DNase activity was present and most of it was left in the supernatant after centrifuging for 60 minutes at 24 000 g. The activity was reduced by dialysis and restored by addition of magnesium ion; it was abolished by 0.01 M citrate. The extracted cellular enzyme thus acted in a manner similar to that of

crystalline pancreatic DNase but it differed from the crystalline enzyme in that it was inhibited by 5 000 μg per ml of streptomycin.

DISCUSSION. — *E. coli* contains an enzyme which can rapidly degrade the DNA of T2 phage. This DNase must be organized in the normal cell in such a way that the first T2 particle to enter the cell is not appreciably attacked. An intracellular reorganization occurs within several minutes of this infection as Luria and Human [10] and Murray *et al* [11] have observed and it is probable that this involves the transport of DNase to new sites inside the cell. Perhaps it is now arranged close to the cell wall but at any rate the process is complete within about 5 minutes as shown later in this paper. The entry of a second particle is then partially blocked since it cannot penetrate the DNase barrier. As Hershey and Chase [8] have recently shown the DNA of T2 enters the cell without its jacket of protein. Consequently the DNA of a superinfecting particle should certainly be susceptible to DNase attack. We have not, however, been able satisfactorily to explain why 40 p. 100 of the superinfecting particle is not broken down and still appears to be in the cell.

T7 also causes an intracellular rearrangement but this apparently does not involve the action of DNase since later adsorbed T2 or T7 can penetrate without breakdown. Further, T7 seems to get through the T2 activated barrier. Perhaps T7 differs from T2 in that it retains its protective protein until it is inside the cell and through the DNase barrier.

In the following sections some observations on the transfer of phosphorus from parental T2 phage to progeny are described and some attempt is made to assess the role of superinfection breakdown in mutual exclusion.

The transfer of phosphorus from T2r+ to its progeny. — A number of workers have found that parental T2r+ phage contributes about 35 p. 100 of its phosphorus to its progeny in multiple infection. We have obtained the same results for transfer in single infection experiments as also have Hershey *et al.* [12]. Since each parental particle transfers the same amount of phosphorus this phosphorus must be spread over more than one progeny particle, at least for infections of greater than 3 fold multiplicity. The following experiment indicates that this phosphorus is not in all the progeny particles. With an infecting ratio of 7 labelled T2r+ per cell, the cells were prematurely lysed at 22, 50 and 110 minutes with cyanide [13]. Readsorption was prevented by making the lysate 5 p. 100 in ammonium sulphate. The phage from each lysate was purified and its content of P^{32} determined. As shown in table I there was a seven fold increase

TABLE I. — The contribution of P^{32} to progeny phage at intervals after infection of cells with 7 labelled T2r+ phage per cell. Premature lysis was carried out with cyanide and 5 p. 100 ammonium sulfate.

MINUTES after infection	BURST SIZE phage per cell	c p m per progeny phage $\times 10$	PER CENT P^{32} transferred to progeny
22.	46	41	18
50	100	16	24
110.	115	12	21

in intracellular phage while the transfer remained essentially constant at 21 p. 100 from 22 minutes onward. Thus about 85 p. 100 of the progeny in this experiment contained little or no parental P^{32} . Since early and late phage have the same genetic properties we have interpreted this result to mean that parental phosphorus transfer is unnecessary for the transfer of genetic characters. This conclusion would be invalidated if fully formed intracellular phage underwent further division. However, Doermann [44] has indicated that once an intracellular phage has reached its infective stage in the cell it is not itself the parent of later formed phage particles. It would also be invalidated if new infective foci were formed within the infected cell after the end of the latent period by those phage particles that are responsible for lysis inhibition. This is improbable since genetic exclusion is almost complete within 5 minutes of infection as shown by Dulbecco [6].

Transfer of phosphorus from superinfecting T2r+ to progeny. — Since infection of the cell with T2r+ rapidly stimulates the formation of a breakdown mechanism it would be expected that the P^{32} of superinfecting T2r+ would be excluded from the progeny. This, in fact, is the case as is shown by the following experiment. Four cultures of *E. coli* were infected with 6.3 T2r+ per cell. Simultaneously with this in the first culture and 1, 2 and 5 minutes later in the other cultures labelled T2r+ was added. The cultures were prematurely lysed at 90 minutes. The results for P^{32} transfer to progeny at the different times are shown in figure 2. In the same figure are plotted the percentages of TCA soluble P^{32} in each culture 22 minutes after superinfection. The P^{32} content of progeny decreases in proportion as the breakdown of superinfecting labelled phage increases. Breakdown is maximum with a superinfecting interval of 5 minutes and exclusion of P^{32} is almost complete. Similar results were obtained when the superinfecting T2 was killed with ultra-violet radiation.

If the intracellular DNase barrier is the sole mechanism preventing the donation of P^{32} to progeny, there should be extensive transfer from superinfecting phage in a system where there is little or no breakdown. To test this hypothesis the transfer of P^{32} from superinfecting T2 to T1 and T7 was measured. There was less than 5 p. 100 transfer when T2 was added 3.5 or 7 minutes after T1 or T7. In addition the transfer of P^{32} from superinfecting T2 to T2 progeny was measured with cells adapted to growth in streptomycin. The P^{32} content of progeny decreased

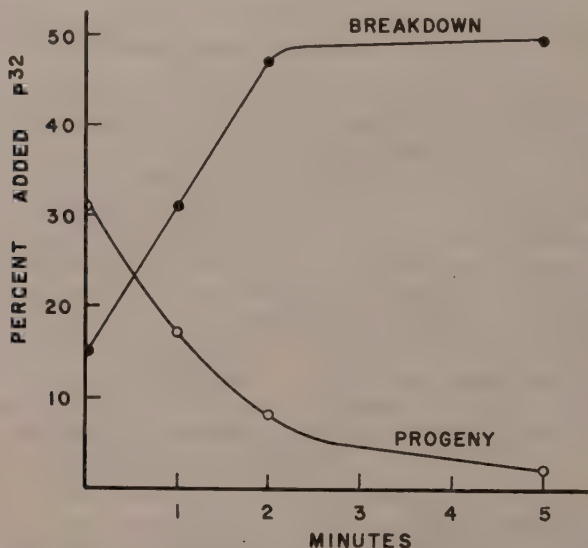


FIG. 2. — Breakdown of superinfecting T2r + phage and transfer of P^{32} to progeny with increasing intervals between primary infection with T2r + and secondary infection with labelled phage.

in the same way as shown in figure 2 for a similar experiment where no streptomycin was present. The presence of streptomycin, however, reduced breakdown to less than 9 p. 100.

DISCUSSION. — The superinfection experiments can be interpreted in two ways. Firstly, there is a close correlation between breakdown and exclusion of P^{32} from superinfecting phage. It might seem that breakdown is therefore a barrier to penetration of the superinfecting T2. When this barrier does not exist, as with T1 or T7 infection, or is suppressed with streptomycin in T2 infection still a second barrier to P^{32} comes into play. Perhaps this second barrier is one that is common to all the T phages.

Secondly, as has been suggested to us by Hershey (personal communication) exclusion of P^{32} may precede breakdown of superinfecting phage. This explanation is still consistent with the correlation between breakdown and P^{32} exclusion. In this view superinfection breakdown would be a sort of side reaction and have nothing to do with the exclusion mechanism. We have no way, as yet, of deciding between the two possibilities.

Our experiments give no direct information on genetic exclusion. It should be mentioned, however, that Dulbecco's results (1952) for exclusion of T2r by T2r+ correlate almost exactly with our present results for P^{32} exclusion. While it has been suggested that P^{32} transfer is not associated with the transfer of hereditary characters it is probable that the P^{32} of parental phage is built into the structure of genetic material. If superinfection breakdown is a mechanism for P^{32} exclusion it could also be responsible for genetic exclusion in that genetic material would be destroyed by it.

SUMMARY.

Infection of *E. coli* with the even numbered T phages or T5 causes extensive breakdown of even numbered phages adsorbed a few minutes later. It is probable that this breakdown is caused by an intracellular desoxyribonuclease present in normal cells but « activated » by the first infecting particle. This phenomenon is not apparent in infection or superinfection with T1 or T7. The parental contribution of T2 phosphorus to T2 progeny is complete in about 22 minutes although less than one quarter of the total phage yield has been produced at this time. Phosphorus of superinfecting T2 is largely excluded from T1 or T7 progeny 3.5 minutes after primary infection. It is also excluded from T2 progeny 5 minutes after primary infection even when superinfection breakdown is suppressed with streptomycin.

BIBLIOGRAPHY

- [1] S. M. LESLEY, R. C. FRENCH and A. F. GRAHAM. *Can. J. Research*, 1950, E, **28**, 281.
- [2] S. M. LESLEY, R. C. FRENCH, A. F. GRAHAM and C. E. VAN ROOYEN. *Can. J. med. Sci.*, 1951, **29**, 128.
- [3] R. C. FRENCH, S. M. LESLEY, A. F. GRAHAM and C. E. VAN ROOYEN. *Can. J. med. Sci.*, 1951, **29**, 144.
- [4] F. W. PUTNAM and L. M. KOZLOFF. *J. biol. Chem.*, 1950, **182**, 243.
- [5] J. J. WEIGLE and M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
- [6] R. DULBECCO. *J. Bact.*, 1952, **63**, 209.
- [7] R. M. HERRIOTT. *J. Bact.*, 1951, **61**, 752.
- [8] A. D. HERSHEY and M. CHASE. *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 39.

- [9] T. F. ANDERSON. *J. Bact.*, 1948, **56**, 403.
- [10] S. E. LURIA and M. L. HUMAN. *J. Bact.*, 1950, **59**, 551.
- [11] R. G. E. MURRAY, D. H. GILLEN, F. C. HEAGY. *J. Bact.*, 1950, **59**, 603.
- [12] A. D. HERSHEY, C. ROESEL, M. CHASE and S. FORMAN. *Carnegie Inst. of Wash. Yearbook*, 1951, **50**, 195.
- [13] A. H. DOERMANN. *Carnegie Inst. of Wash. Yearbook*, 1948, **47**, 176.
- [14] A. H. DOERMANN. *Feder. Proc.*, 1951, **10**, 591.

INTRACELLULAR PHASES IN THE REPRODUCTIVE CYCLE OF BACTERIOPHAGE T2

by A. D. HERSHEY.

*(Carnegie Institution of Washington
Cold Spring Harbor, New York.)*

Several lines of investigation have shown that vegetative virus differs in structure from resting virus. Evidently the nature of the change from one form to another is an important clue to the problem of viral multiplication. This paper will summarize information about the intracellular transformations of T2 and related bacteriophages. For convenience of presentation, the facts will be classified chiefly according to the experimental methods by which they have been gained.

RESTING PHAGE.

It is necessary to recall the following facts about resting particles of T2. They consist of uniform, tadpole-shaped structures weighing about 10^{-15} g. They are composed chiefly of protein (50 to 60 p. 100) and desoxypentose nucleic acid (40 to 50 p. 100) [1, 2]. The protein is principally or entirely confined to a « ghost » from which the nucleic acid can be released by osmotic shock [3]. The particles in purified preparations are almost all infective [4]. They attach to bacteria by the ends of their tails [5], and this specific property is retained by ghosts that have been freed of nucleic acid by treatment with desoxyribonuclease [3]. The ghosts also contain the sole or principal antigens of the phage particles [6]. This, and the fact that the phage nucleic acid is made sensitive to desoxyribonuclease by osmotic shock, shows that the ghosts are membranes that surround the nucleic acid of the intact particle. The association between the nucleic acid and the protein of the membranes depends on the intactness of the membranes, because the latter can be separated from the nucleic acid (after osmotic shock) either by adsorption to bacteria or by precipitation with antiphage serum [6]. Particles of T2 should not any longer be called nucleoprotein.

MICROSCOPY OF INFECTED BACTERIA.

Anderson [7] published electron micrographs of bacteria infected with T2 and T4 about which he said that some of the adsorbed phage particles « are mere blebs on the host-cell wall ; most of the internal structure of these particles has disappeared, presumably into the protoplasm of the host ». However, no systematic morphological study of the initial stages of infection has yet appeared, presumably because of technical difficulties [8].

Microscopic observations of phage particles adsorbed to empty bacterial membranes likewise suggested that some alteration of the particles had occurred, but did not lead to any definite conclusions [9].

INFECTIVITY MEASUREMENTS.

Doermann and collaborators [10, 11, 12] measured the yields of infective virus that are obtained by breaking open cells infected with phages T2, T3, and T4. They found that during the first half of the latent period, no significant amounts of virus could be recovered. During the second half of the latent period, infective phage reappeared and increased in numbers at a linear rate. From these results, one could suppose that the infecting virus particles could not be recovered simply because their ability to attach to bacteria had been exhausted by the primary adsorption. The daughter virus, appearing near the midpoint of the latent period, would then be the first recoverable particles.

This interpretation was made unlikely by experiments on the kinetics of genetic recombination. Doermann and Dissosway [12] found that large numbers of recombinants were already present among the first virus particles liberated by premature lysis of mixedly infected bacteria. This result had to be reconciled with evidence that multiplication precedes recombination [13]. Luria's thinking about multiplicity reactivation [14] assisted in this. Doermann's interpretation [15] is as follows.

Virus multiplies (and recombines) in some noninfective form during the first half of the latent period. This hypothetical virus may be called vegetative virus. The reappearance of infective virus during the second half of the latent period is not the direct result of multiplication, but calls for the conversion of vegetative virus into mature virus. Mature virus is evidently the intracellular counterpart of resting virus, and is presumably isolated physiologically from further cellular events. The experiments on premature lysis thus focus attention on the new problem of qualitative intracellular transformations, as distinct from the old problem of viral multiplication.

EXPERIMENTS WITH DESOXYRIBONUCLEASE.

Facts outlined above indicate that the nucleic acid of resting phage is protected from the enzyme desoxyribonuclease by the phage membrane. The enzyme thus furnishes a means of detecting alterations in the membrane of the phage particle. With P^{32} as a nucleic acid label, and S^{35} as a membrane protein label, it could be shown that desoxyribonuclease dissolves phage nucleic acid out of heat-killed infected bacteria, leaving the phage membranes attached [6]. It made little difference whether the bacteria were heated before or after infection, and freezing-and-thawing was as effective as heating. Neither heating nor freezing-and-thawing had much effect on unadsorbed phage. These treatments served primarily, therefore, to make the bacterial cells permeable to the enzyme. Hershey and Chase [6] concluded from these results that adsorption to bacteria was followed by an alteration of the phage membrane and by the entry into the cell of the phage nucleic acid.

Further, by allowing phage to attach to bacterial fragments instead of intact cells, it was found that at least half the phage nucleic acid escaped spontaneously from the phage membranes. This result made it likely that the phage membranes do not accompany the phage nucleic acid into the cell.

According to this interpretation, the phage membrane is a specialized instrument for injecting the viral protoplasm (chiefly nucleic acid) into the cell, and for protecting it during extracellular sojourns. The membrane substance (chiefly protein), then, might have no function during intracellular multiplication.

ADSORPTION OF PHAGE TO BACTERIA.

The results just summarized call for a slight amplification of current ideas about the adsorption of phage to bacteria. The sequence of events seems to be as follows. The first step is a reversible attachment that leaves bacterium and phage unaffected [16]. At suitable temperatures and in suitable ionic environments this is followed by an irreversible attachment of the phage membrane [16]. These two steps are so fast under optimal conditions that nearly every phage particle colliding with the surface of the cell makes an irreversible attachment. The completion of these two steps can be prevented by rapid stirring of the phage-bacterium mixture [7], which shows that there is an appreciable interval between the two steps. The third step is the passage of the contents of the phage membrane into the cell.

Strictly speaking, the methods used by Garen and Puck [16]

did not distinguish between the second and third steps. The existence of the second step is indicated by the fact that viral S^{35} does not readily elute from infected cells in media in which attachment fails. Likewise, elution of adsorbed viral S^{35} brought about by rapid stirring [6] is not a reversal of the second step, because the eluted material is not very well readsorbed to bacteria. Presumably it consists of empty membranes many of which have lost their tails.

The third step is virtually completed within 5 minutes at 37°C in buffered saline. None of the three steps depends on bacterial metabolism. This clearly differentiates them from steps that follow [17, 18].

THE INTRACELLULAR FATE OF PHAGE PROTEIN.

When one infects bacteria with phage that is isotopically labeled, and then isolates the phage progeny by centrifugation, one finds a variable fraction of the parental label in the progeny. The first of many such experiments was reported by Putnam and Kozloff [19], who used the label P^{32} . They found that about 30 p. 100 of the radioactivity was transferred from the infecting phage to its progeny during a single intrabacterial cycle.

If it is true that the membrane protein plays no role in intracellular growth of virus, the transfer of a protein label like S^{35} ought to be small, whereas the transfer of a nucleic acid label like P^{32} might be large. On the contrary, Hershey et al. [20] and Kozloff [21] found no significant difference in the transfer of protein and nucleic acid labels. The question of protein transfer was therefore reinvestigated by Hershey and Chase [6].

They found that all or most of the parental S^{35} that appears in the isolated phage progeny consists of remnants of the parental membranes. The contaminating material could not be (or was not) separated from the phage progeny by fractional centrifugation. Both were precipitated by antiphage serum. Even the test of adsorption to bacteria failed to separate the two except under rather special conditions.

The contaminant was identified in the following ways. First of all, bacteria infected with S^{35} -labeled phage, and then artificially lysed before mature phage progeny had appeared, yielded S^{35} -labeled material identical in amount and kind to that contaminating the final progeny. Secondly, bacteria infected with S^{35} -labeled phage, and then spun in a Waring blender, released into the fluid small S^{35} -labeled particles. These could be sedimented at high speed, were precipitated by antiphage serum, and even readsorbed weakly to bacteria. They did not

contain much phosphorus, however, and therefore consisted of more-or-less intact, empty, phage membranes. Thirdly, the bacteria from which the S^{35} -labeled phage membranes had been removed produced a normal yield of phage, and this progeny could readily be obtained nearly free from parental S^{35} .

The experiments with the Waring blender confirmed neatly that infection of bacteria by T2 consists of the entry of most of the phage nucleic acid, but very little of the membrane protein, into the cell.

Strictly speaking, the experiments of Hershey and Chase [6] show only that the sulfur-containing amino acids of the phage membrane do not enter into the phage progeny. They do not necessarily invalidate the results of Kozloff [21], who used N^{15} as label. There may be transfer of some sulfur-free protein to progeny, and there may be some use of parental nonprotein nitrogen for the synthesis of progeny protein.

THE INTRACELLULAR FATE OF PHAGE NUCLEIC ACID.

Putnam and Kozloff [19] measured the amount of P^{32} appearing in the total viral progeny after infecting bacteria with phage labeled with the isotope. They found about one-third of the parental phosphorus in the offspring phage, and most of the remainder in nonsedimentable form in the culture fluid. They suggested that the virus might be composed of two classes of structure containing phosphorus: one conserved during multiplication and one not. Following up a suggestion of Cohen, Maaløe and Watson [22] tested this idea by carrying P^{32} -labeled phage through two successive cycles of growth in unlabeled bacteria. They found that only one-third of the P^{32} present in the first cycle progeny was conserved during the second cycle of growth. Their result showed that the conserved atoms of phosphorus enter into all parts of the viral progeny that contain phosphorus, not into special parts. This result was confirmed by Hershey et al. [20]. These authors and Watson and Maaløe [23] suggested various improvements in the technique of transfer experiments, which raise the measured efficiency of transfer to nearly 50 p. 100 of the adsorbed parental phosphorus. C^{14} -labeled purines are transferred with a similar high efficiency [23].

The mechanism of transfer of nucleic acid labels from parental phage to progeny remains unclear. In particular, one would like to know whether they are conserved during multiplication in the form of phage nucleic acid, or as smaller fragments, and whether, indeed, they are conserved directly in the form of vegetative phage. The latter possibility has the practical importance

that it suggests an initial strategy for the attempt to identify the multiplying structures [6].

Kozloff [21, 24] concluded from tracer experiments that the transfer takes an indirect metabolic route through breakdown products. If, as his discussion seems to imply, he meant breakdown products smaller than nucleic acid, his conclusion does not appear to be necessary. We give our own estimate of his findings below, omitting reference to his data on transfer of protein nitrogen, which are probably unreliable [6]. He makes the following four points.

1° *Extracellular nitrogen and phosphorus of viral origin appear during the latent period of viral growth.* — Technically, this finding is of doubtful significance since it is uncertain how much of the extracellular material is really of viral origin, and how much that is of viral origin comes from bacteria that are going to yield phage. At most it means that the injection of viral nucleic acid into the cell is not perfectly efficient ; about 20 p. 100 of it leaks out into the culture fluid.

2° *The material derived from the parents that ends up in progeny nucleic acid contains an excess of phosphorus over nitrogen as compared to whole viral nucleic acid.* — This result tends to disagree with that of Watson and Maaløe [23], who find equal efficiencies of transfer of phosphorus and purine carbon. Kozloff's method (double labeling with P^{32} and N^{15}) is more sensitive, however. His result may mean that some of the phosphorus, at least, is transferred as fragments smaller than polynucleotides, or that there is, after all, a special part of the nucleic acid that is transferred (cf. [22]). These discrepancies call for more experiments.

3° *The transfer of nitrogen from phage inactivated by ultra-violet light to the nucleic acid of the progeny of active phage in mixedly infected bacteria is just as efficient as the corresponding transfer from parents to progeny.* — The point of this experiment is that genetic markers from the irradiated phage do not appear in the progeny under the conditions used. Its result, which has been confirmed by Watson and Maaløe [23], shows that viral nucleic acid that does not participate specifically in the reproductive process can be used for the synthesis of viral material. The remarkable fact that its use is neither more nor less efficient than the use of the parental material suggests, on first view, a common mechanism for the transfer. The force of the coincidence disappears, however, when one considers some of the factors that are likely to limit the efficiency. Whether the transfer is direct or indirect, the measured efficiency is subject to at least five factors whose importance remains to be assessed. These are :

- a) The efficiency of the injection of viral nucleic acid into the cells ;
 - b) The amount of tracer that leaks out of the infected cells before lysis ;
 - c) The efficiency of conservation of assimilated label by vegetative phage ;
 - d) The proportion of infected cells that yield few or no phage progeny ;
 - e) The efficiency of conversion of vegetative to mature phage.
- If some of these are primary factors limiting the use of labeled nucleic acid, an identical efficiency for quite different mechanisms of use is easily possible.

4° *A phage progeny coming from bacteria infected with unlabeled T7, then superinfected eight minutes later with P^{32} -labeled T6, contained about 5 p. 100 of the total P^{32} in sedimentable particles (presumably T7) that could not be accounted for as infective T6 particles.* — The technical difficulties inherent in experiments of this kind have not been adequately explored. Kozloff's result has, however, been confirmed (Watson and Maalöe, personal communication). It tends to show that foreign nucleic acid can be used for viral synthesis. The same conclusion follows from the evidence that bacterial desoxypentose nucleic acid serves as a substrate for viral growth [25, 26], apparently with rather high efficiency. This conclusion does not seem to have much bearing on the mechanism of transfer from parents to progeny.

The principal facts that emerge from these experiments are that parental nucleic acid labels are transferred to viral progeny with rather high efficiency, and that the same is true of non-parental labels present in the cell as desoxypentose nucleic acid. An experiment that will decide whether the mechanism of transfer is the same in both instances remains to be devised.

THE INCORPORATION OF NEW MATERIALS INTO PHAGE.

So far we have been looking at the parental viral material conserved during multiplication of phage. This is, of course, a quantitatively insignificant source of viral substances formed in the infected cell. The bulk of the precursor material has to be assimilated from the culture medium. It is convenient to think of this material as consisting of two portions, one assimilated before infection, and one after. The relative sizes of these two portions depends on factors to be considered below.

The material that is assimilated before infection and is available for growth of T6 contains phosphorus, purines, and pyrimidines, but little or no nitrogen or sulfur that is used to form

viral protein [25, 26, 35]. The pyrimidines, at least, must be derived from the bacterial desoxypentose nucleic acid (DNA), of which the cell contains enough to form 50 to 100 particles of T6 [27]. The preassimilated materials that end up in phage nucleic acid contain an excess of nitrogen over phosphorus as compared with whole bacterial DNA [25].

Labaw [28] found that the amount of preassimilated phosphorus that enters into phage is sensibly equal when averaged *per phage particle* for T1, T2, T2r, T3, T5, and T7. This suggested to him, as an analogous result had to Kozloff et al. [25], that each phage particle in the yield receives a fixed amount of preassimilated bacterial substance. This conclusion would be meaningless unless it was supposed that each virus particle contained a large, indispensable piece of host DNA, that would be the same for all viral species having a common host. Fortunately for the concept of species specificity of DNA, an alternative interpretation is possible, namely, that there is a fixed amount of preassimilated bacterial substance available for conversion to viral substance of several kinds. Labaw does not give viral yields per bacterium for his experiments (such data are unreliable, in fact, under the usual conditions of this type of experiment), but in general the numerical yields for the phages listed do not differ very much. His results are consistent with either interpretation.

The idea of a fixed contribution of preassimilated host material to each phage particle is excluded by the examination of premature viral yields. These are found to contain much larger quantities of preassimilated pyrimidines [26] and preassimilated phosphorus [29] per phage particle than later yields of the same virus.

Since mature virus is, by definition, drawn from a pool of immature virus, the experiments just referred to tell us something about this pool, namely, that it is receiving additions of DNA during the period of maturation of the virus. Either vegetative phage itself contains the DNA and continues to multiply during this time, or the process of maturation calls for the insertion of DNA into vegetative phage, in which case it is the pool of DNA that is growing. This information may be compared with the facts that immature phage is at this time undergoing genetic recombination [30], that the DNA content of the infected cell is increasing rapidly [31], and that phage-precursor phosphorus is still being assimilated by the bacterium [29].

The simple idea of a fixed amount of preassimilated bacterial phosphorus entering early into a nonspecific pool of viral precursor [29] seems adequate to explain the fact that this contribution forms a small part of the total viral phosphorus when the

bulk yield is large, and a large part when the bulk yield is small. This idea is all the more plausible if the pool is the same for different viruses, as indicated by the results of Labaw [28].

Before turning to the assimilation of viral precursors after infection, it is worth recalling that infection (by lytic phages) has immediate and profound effects on the physiology of the bacterium. Cohen [32, 33] has ably documented his generalization that these changes reflect the diversion of metabolic functions, after some stripping down, from the synthesis of bacterial substances to viral substances. (Some of the changes do not depend on viral growth: they are produced by empty phage membranes [3], and by phage inactivated in various ways.) He finds, in particular, that the synthesis, or at least the accumulation, of bacterial DNA ceases after infection. In terms of this generalization, the arbitrary division of viral precursors into materials assimilated before and after infection becomes a natural one.

There is also an empirical basis for the division. The assimilation of labeled viral precursor phosphorus before infection occurs at a rate equal to that of bacterial growth [29], showing that the rate of metabolic turnover of the precursor pool is small by comparison. Immediately after infection, the rate of assimilation of labeled precursor phosphorus increases greatly [29]. This cannot reflect solely a rapid exchange between cell and medium, because it is followed by a similarly rapid increase of purines and pyrimidines beginning at about 12 minutes, and of DNA beginning at about 20 minutes [34]. The virus thus initiates both quantitative and qualitative changes in DNA synthesis.

One would like to know which starts to form first, viral protein or viral DNA. Cohen [31] has shown that a greatly accelerated accumulation of protein starts immediately on infection with T2, whereas DNA accumulation is stopped for 7 to 10 minutes, and then starts off gradually. These data give a very incomplete answer to our question, because they are obscured by the disappearance of bacterial DNA, and also, very likely, by the synthesis of nonviral substances.

Another kind of incomplete answer has been gained by looking at the other end of protein and DNA synthesis: in this case viral protein and viral DNA. Stent and Maaløe [29] and Maaløe and Symonds [35] have studied the kinetics of phosphorus and sulfur assimilation by infected bacteria in a novel way. Their results can be summarized as follows. When the growth of phage in an infected cell is stopped by cyanide, and the yield of mature virus is isolated, it is found to contain phosphorus atoms that were assimilated, on the average, 14 minutes earlier. Its sulfur atoms, on the other hand, were assimilated only 7 minutes earlier. The

intervals are about the same whether viral growth is stopped early or late. These data show that viral protein is synthesized relatively late during the latent period, and leave open the possibility that the formation of viral DNA precedes that of protein.

Biochemical studies have clarified several questions and answered at least one. We now know that the second half of the latent period is not devoted solely to the conversion of immature into mature phage. It is a period of rapid synthesis of viral material, and very probably a period of continued multiplication of vegetative phage.

THE SEARCH FOR VEGETATIVE PHAGE.

Levinthal and Fisher [36] have made a systematic study of characteristic particles (« donuts ») that are released, together with mature phage particles, from infected bacteria burst by decompression under nitrous oxide [37]. The donuts are round, tailless particles of similar size to mature phage particles. They often show central depressions after drying for examination in the electronic microscope. This description covers all particles, besides particles with tails, that are characteristic of preparations from infected bacteria.

The donuts are not found in extracts made during the early part of the latent period. They first appear about three minutes before mature phage particles are found. They increase in number somewhat faster at first than mature phage particle do, but never exceed 30 or 40 per bacterium, and are soon outnumbered by mature particles. The donuts do not adsorb to bacteria, whereas all the particles with tails do so.

Similar particles are found after lysis of cells infected in a medium containing proflavine [38], under conditions in which appreciable numbers of tailed particles or infective particles are not formed. Proflavine acts in all respects as if it blocked only a terminal step in the maturation of phage [39]. Proflavine donuts can be obtained in substantial yields, and preliminary results show that they contain sulfur but little or no DNA, give at least some of the immunological reactions of phage particles, and do not adsorb to bacteria. The particles are thus incomplete with respect to tail, DNA content, and infectivity.

The results of Levinthal and Fisher, and of Luria, are consistent with each other and with the idea that the donuts are precursors of mature phage particles.

Incomplete particles have been detected in still another way [35]. Cyanide lysates of infected cultures growing in S^{35} -labeled medium contain S^{35} -labeled particles that appear a little earlier during the latent period than mature phage particles, and

cause the small-particle fraction to contain more S^{35} per infective phage particle when prepared from early lysates than when prepared from late ones. They are smaller or less dense than the infective particles, so that the two can be separated by repeated centrifugation. Their number remains approximately constant during the period in which infective particles are increasing, and corresponds in sulfur content to 25 or 50 phage particles per cell. They are precipitated by antiphage serum and adsorbed to bacteria. Since a similar study of lysates containing P^{32} [40] did not reveal labeled noninfective particles, the S^{35} -labeled particles must contain little phosphorus. The particles identified radiochemically thus correspond to donuts in every property tested except adsorption to bacteria. The particles of Maaløe and Symonds appear to be completed with respect to membrane and tail (they have not been examined microscopically), but lacking DNA and infectivity. Since their methods should also have detected donuts, if present, it may be that the different methods of preparation are responsible for the different properties of the two kinds of particle.

Maaløe and Symonds [35] made one more important contribution to the information about noninfective particles. When S^{35} was added to the culture 12 to 16 minutes after infection, and the culture was allowed to lyse spontaneously, the yield contained S^{35} -labeled noninfective particles. This shows that the 25 to 50 noninfective particles per cell found during the latter part of the latent period represent a population whose individual members are continually being replaced by others. The evidence that they are precursors of mature phage particles thus becomes very strong indeed.

Actually, two alternatives must be distinguished as to the origin of the noninfective particles [35]. They may be immature phage particles that have not yet received their major quota of DNA. Or, they may be derived by manipulative loss from particles that possessed both DNA and membranes; presumably immature, unstable particles as yet unidentified. The former alternative would seem to imply that important functions of intracellular phage, including the reformation of membrane material, operate independently of the large bulk of DNA that ends up in the finished particles. There is, at present, nothing to oppose this view except that it fails to explain why noninfective particles containing appreciable amounts of DNA have not been found as well.

In connection with the possibility that the incomplete particles described above are artifacts, it should be recalled that intracellular phage DNA is readily made sensitive to pancreatic desoxyribonuclease, and that cyanide lysates of infected cultures

contain something that depolymerizes phage DNA added in soluble form (Hershey and Chase [6], and unpublished).

Attempts are also being made to detect intermediate stages in phage development by immunological methods [38, 41]. The preliminary results show promise that these methods will prove useful for the precise identification and assay of certain phage components. As yet the experiments have not been carried far enough to clarify the rather confused picture given by other methods.

It should be noted that none of these methods has yielded any information about intracellular viral DNA, which, rightly or wrongly, we are now inclined to associate with vegetative phage. It is especially fortunate, therefore, that the quantitative chemical distinction between bacterial and viral DNA now appears to be feasible. Bacterial DNA contains cytosine [42], which is absent from the DNA of T2 [43]. The DNA of T2, T4, and T6 contains an unidentified substance, probably a pyrimidine, that is absent from bacterial DNA (S. S. Cohen, personal communication). These findings have been confirmed by Hershey and Chase (unpublished).

GENERAL CONCLUSIONS.

Infection of *Escherichia coli* B by its lytic phage T2 is initiated by the passage of the phage protoplasm (chiefly desoxypentose nucleic acid) into the cell, which leaves most of the phage membrane (chiefly protein) at the cell surface in nonfunctional form. Replication of genetic determinants of the virus begins shortly after infection. We assume that this involves the replication of some of the nonmembrane components, and know that it is geometric [44], precedes the reappearance of infective phage particles in the cell, and is accompanied by genetic recombination. Since gene replication starts off without benefit of the parental membranes, one suspects that it occurs independently of membrane protein. It has *not* been shown that the synthesis of phage DNA precedes the synthesis of membrane protein, but methods for testing this possibility are now available.

The reformation of infective particles in the cell involves as one of its steps the reconstitution *de novo* of membranes in which the products of gene replication are included. A mechanism by which genetic determinants not contained in the finished particle nevertheless contribute to its properties has to be provided [20, 45]. These are properties of membranes, which reinforces the notion that gene replication and membrane replication are somehow different.

Another indication of this difference is the fact that parental DNA components are, and parental membrane components are

not, materially conserved during reproduction. Whether this result has any fundamental significance is not yet clear.

The study of viral infections of bacteria is continually yielding results that could not have been predicted from results that went before. At best, this means that progress is being made. At worst it means that our field of endeavor is in a healthy condition, amenable to progress.

REFERENCES

- [1] A. R. TAYLOR. *J. biol. Chem.*, 1946, **165**, 271-284.
- [2] R. M. HERRIOTT and J. L. BARLOW. *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 17-28.
- [3] R. M. HERRIOTT. *J. Bact.*, 1951, **61**, 752-754.
- [4] S. E. LURIA, R. C. WILLIAMS, and R. C. BACKUS. *J. Bact.*, 1951, **61**, 179-188.
- [5] T. F. ANDERSON. *Trans. New York Acad. Sci.*, 1951, **13**, 130-134.
- [6] A. D. HERSHEY and M. CHASE. *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 39-56.
- [7] T. F. ANDERSON. *Bot. Rev.*, 1949, **15**, 464-505.
- [8] T. F. ANDERSON. *Am. Nat.*, 1952, **84**, 91-100.
- [9] W. WEIDEL. *Zeitschr. Naturforsch.*, 1951, **6 b**, 251-259.
- [10] A. H. DOERMANN. *Carnegie Inst. Washington Yr. Bk.*, 1948, **47**, 176-182.
- [11] T. F. ANDERSON and A. H. DOERMANN. *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 657-667.
- [12] A. H. DOERMANN and C. F.-R. DISSOSWAY. *Carnegie Inst. Washington Yr. Bk.*, 1949, **48**, 170-176.
- [13] A. D. HERSHEY and R. ROTMAN. *Genetics*, 1949, **34**, 44-71.
- [14] S. E. LURIA. *Science*, 1950, **111**, 507-511.
- [15] A. H. DOERMANN. *Fed. Proc.*, 1951, **10**, 591-594.
- [16] A. GAREN and T. PUCK. *J. exp. Med.*, 1951, **94**, 177-189.
- [17] S. BENZER. *J. Bact.*, 1952, **63**, 59-72.
- [18] R. DULBECCO. *J. Bact.*, 1952, **63**, 209-217.
- [19] F. W. PUTNAM and L. KOZLOFF. *J. biol. Chem.*, 1950, **182**, 243-250.
- [20] A. D. HERSHEY, C. ROESEL, M. CHASE, and S. FORMAN. *Carnegie Inst. Washington Yr. Bk.*, 1951, **50**, 195-200.
- [21] L. M. KOZLOFF. *J. biol. Chem.*, 1952, **194**, 95-108.
- [22] O. MAALÖE and J. D. WATSON. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1951, **37**, 507-513.
- [23] J. D. WATSON and O. MAALÖE. *Acta Path. Microb. Scand.*, in press.
- [24] L. M. KOZLOFF. *J. biol. Chem.*, 1952, **194**, 83-93.
- [25] L. M. KOZLOFF, K. KNOWLTON, F. W. PUTNAM, and E. A. EVANS, JR. *J. biol. Chem.*, 1951, 101-116.
- [26] L. L. WEED and S. S. COHEN. *J. biol. Chem.*, 1951, **192**, 693-700.
- [27] L. M. KOZLOFF and F. W. PUTNAM. *J. biol. Chem.*, 1950, **182**, 229-242.
- [28] L. W. LABAW. *J. Bact.*, 1951, **62**, 169-173.
- [29] G. S. STENT and O. MAALÖE. *Biochem. Biophys. Acta*, 1952, in press.
- [30] A. D. HERSHEY and M. CHASE. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 471-479.

- [31] S. S. COHEN. *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 281-293.
- [32] S. S. COHEN. *Bact. Rev.*, 1949, **13**, 1-24.
- [33] S. S. COHEN. *Nature*, 1951, **168**, 746-749.
- [34] S. S. COHEN and R. ARBOGAST. *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 637-650.
- [35] O. MAALÖE and N. SYMONDS. *J. Bact.*, in press.
- [36] C. LEVINTHAL and H. FISHER. In press.
- [37] D. FRAZER. *Nature*, 1951, **167**, 33-35.
- [38] S. E. LURIA. *Symposium on the Nature of Virus Multiplication, Society for General Microbiology*, in press.
- [39] R. A. C. FOSTER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 795-809.
- [40] O. MAALÖE and G. STENT. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1952, **30**, 149-157.
- [41] P. ROUNTREE. *Brit. J. exp. Path.*, 1951, **32**, 341-352.
- [42] J. D. SMITH and G. R. WYATT. *Biochem. J.*, 1951, **49**, 144-148.
- [43] A. MARSHAK. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 1951, **37**, 299-303.
- [44] S. E. LURIA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 463-470.
- [45] A. NOVICK and L. SZILARD. *Science*, 1951, **113**, 34-35.

THE PRODUCTION OF INCOMPLETE BACTERIOPHAGE PARTICLES BY THE ACTION OF PROFLAVINE AND THE PROPERTIES OF THE INCOMPLETE PARTICLES (1)

by R. I. DE MARS, S. E. LURIA, H. FISHER and G. LEVINTHAL.

(Department of Bacteriology,
University of Illinois, Urbana, Illinois
and Department of Physics,
University of Michigan, Ann Arbor, Michigan.)

Infectious phage cannot be recovered from infected bacteria during the first portion of the latent period (see Doermann, 1952). This « eclipse » in infectivity has been explained by the finding (Hershey and Chase, 1952) that the infecting phage particles separate into a sulfur-containing, phosphorus-free antigenic portion, which remains outside the cell and takes no part in reproduction, and a phosphorus-containing, sulfur-free portion that penetrates the host cell. Genetic evidence (see Doermann, 1951; Luria, 1951) shows that the first infectious phage particles that appear after the eclipse period represent end-products of reproduction.

Electron micrographs of prematurely disrupted cells of *Escherichia coli* infected with phage T2 have shown that morphologically normal phage particles appear when infectious elements become detectable (Levinthal and Fisher, 1952). A few minutes earlier there appear in the bacteria some round, tailless elements (see also Hercik, 1951). These elements ultimately disappear as the mature particles are formed. In the present paper we describe the production of almost pure preparations of premature phage elements when the formation of mature phage is prevented by the use of the acridine dye, proflavine. This dye allows lysis of infected bacteria to occur without liberation of infectious phage (Foster, 1948).

(1) This work was supported by grants from the American Cancer Society (recommended by the Committee on Growth), the Research Board of the University of Illinois and the U. S. Public Health Service.

MATERIALS AND METHODS.

MATERIALS. — The T phages, their host *Escherichia coli*, strain B, and the standard methods for handling them have been described (Adams, 1950). The proflavine was 2-6-diaminoacridinium sulfate (Abbott). Lysates were generally made in synthetic medium M—9 (glucose — 4 g; NH_4Cl — 1 g; MgSO_4 — 0.2 g; M/15 phosphate buffer — 1 000 ml). The media employed in experiments with isotopic tracers are given in the experimental section.

Serological methods. — 1° *Antibody blocking power.* — This test measures the power of a material to combine with the neutralizing antibody of an antiphage serum and thereby to reduce its phage neutralizing titer. Such power is present in phage particles and also in noninfectious, ultrafiltrable material that accompanies certain phages (Burnet, 1933). A sample test on purified phage T2 and on an ultrafiltrate of a T2 lysate is given in table I. Details of the method will be published elsewhere.

2° *Complement fixation tests* were done with rabbit antisera against partially purified phage. The sera were absorbed with bacterial host material to remove most of the antibacterial antibody. Complement fixation with these adsorbed sera is quite specific for phage antigens, with cross reactions among phages similar to those found in neutralization tests. The colorimetric technique used in the complement fixation was a modification of the method given by Kabat and Mayer 1948 (2).

Ultrafiltration. — Gradocol membranes (average pore diameter 49 or 74 μ) were obtained from A. Gallenkamp and Co., London. All solutions to be filtered contained 0.8 p. 100 Difco nutrient broth, powdered.

Premature lysis of infected bacteria was produced either by the « cyanide-lysis from without » method of Doermann (1952) or, for electron microscopy, by the decompression method (Fraser, 1951; Levinthal and Fisher, 1952).

Electron micrographic counts were done according to Backus and Williams (1950) using polystyrene latex particles as indicators. The results of this method are only subject to sampling errors, except for particles with a tendency to clump. For phage particles the method gives counts very close to plaque count titers (Luria, Williams and Backus, 1951 and unpublished). The premature particles described below have an even lower tendency to clump than the mature phage.

(2) The authors are indebted to Dr. Yvonne T. Lanni and Miss Shirley J. Nice for the complement fixation data. Details of the methods will be presented in a separate publication with studies on complement fixation with phage.

TABLE I. — Combining power for neutralizing antibody ; phage and phage ultrafiltrate.

Phage T2, purified and counted in the electron microscope, was irradiated with ultraviolet light (a treatment that does not reduce the combining power of phage for neutralizing antibody) and diluted in nutrient broth.

The ultrafiltrate was obtained from a phage stock in M-9 medium, after addition of nutrient broth, by filtration through a 74 m μ gradocol membrane.

Mixtures of equal volume, containing antiserum against T2 and various amounts of the materials to be tested, were incubated at 48° C for 4 hours. Then, a constant amount of phage T2 r was added to each mixture and the mixtures were further incubated for 4 hours. Finally, each mixture was tested for active phage. Each mixture contained 10 micrograms of streptomycin per ml. This drug does not affect the reaction and is used routinely in these tests to prevent growth of contaminant bacteria, especially when the tests are run at 37° C.

TUBE No	CONTENTS				ASSAY of test phage	PERCENT titer of test phage
1	Broth	4 hrs at 48° C	Add test phage T2 r	4 hrs at 48° C	$7,7 \times 10^5$	100
2	Serum (1).				$2,2 \times 10^4$	3
3	Serum + $7,0 \times 10^9$ T2				$7,7 \times 10^5$	100
4	— + $2,3 \times 10^9$ —				$4,8 \times 10^5$	62
5	— + $7,7 \times 10^8$ —				$1,8 \times 10^5$	23
6	— + $2,6 \times 10^8$ —				$4,3 \times 10^4$	6
7	— + $8,7 \times 10^7$ —				$1,6 \times 10^4$	2
8	Serum + ultrafiltrate dil. 1:3. .				$1,7 \times 10^5$	22
9	— + — — 1:9 .				$5,3 \times 10^4$	7
10	— + — — 1:27 .				$2,5 \times 10^4$	3

(1) Serum anti-T2 1:40 000.

Radioactivity measurements were made on thin specimens, produced by evaporating 0.1 ml samples on the central area of aluminum cups, using a G—M counter with a mica window (3.5 mg cm⁻²). The counting efficiency was about 20 p. 100 for P³², 5 p. 100 for S³⁵.

RESULTS.

Lysates prepared in the presence of proflavine. — Proflavine lysates were prepared by adding about 10^9 phage particles per ml to a growing aerated culture of *E. coli* B in M—9 medium containing about 2×10^8 cells per ml. After 1 to 3 minutes, the proper concentration of proflavine was added and vigorous aeration continued. Mass lysis followed at times varying between 1.5 and 3 hours. Most proflavine lysates contained from 10^6 to

5×10^7 infectious units per ml, instead of 5×10^{10} to 2×10^{11} in control lysates. With phages T2, T2r and T5 the proflavine concentration used was 3.5 or 4 micrograms per ml; with T6, concentrations of 2 to 4 micrograms per ml were used. These concentrations proved the most suitable in inducing liberation of premature phage forms only. Although proflavine in such concentrations causes some inactivation of active phage, electron

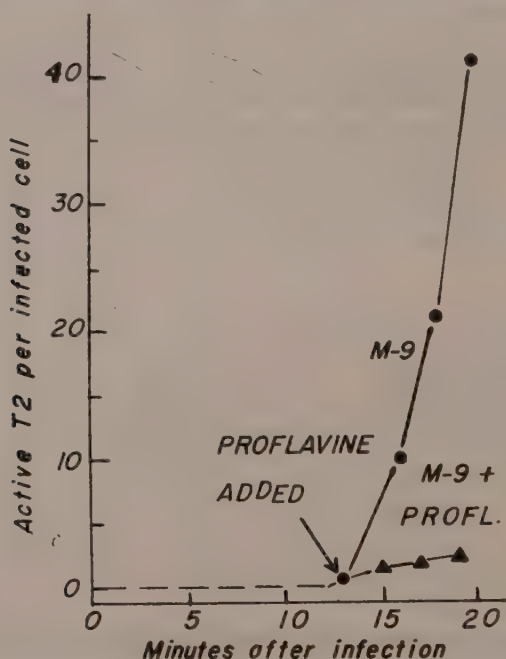


FIG. 1. — The intracellular phage T2 in the presence of proflavine. Proflavine (4 γ /ml) was added to a portion of a T2-infected culture 13 minutes after infection. At intervals, samples from the proflavine culture and from the control culture were diluted in a mixture of KCN and phage T6. Platings were done after 1 hour of incubation at 37°.

micrography of phage inactivated by proflavine showed morphologically normal particles.

Addition of the above concentrations of proflavine to infected bacteria at any time during the eclipse period prevents liberation of active phage in one-step growth experiments (Foster, 1948); this was confirmed in our work. Addition of proflavine at a time when a few active phage particles are already present, as revealed by premature lysis, stops almost completely their increase in number (figure 1).

Ultrafiltration of proflavine lysates. — Ultrafiltrates of infected

bacteria prematurely lysed in the absence of proflavine contain a noninfectious material with blocking power for phage antibody. The amount of this material increases as the time of normal lysis approaches (figure 2). The properties of this ultrafiltrable material will be reported elsewhere. It seemed possible that proflavine lysates would contain an excess of the ultrafiltrable material.

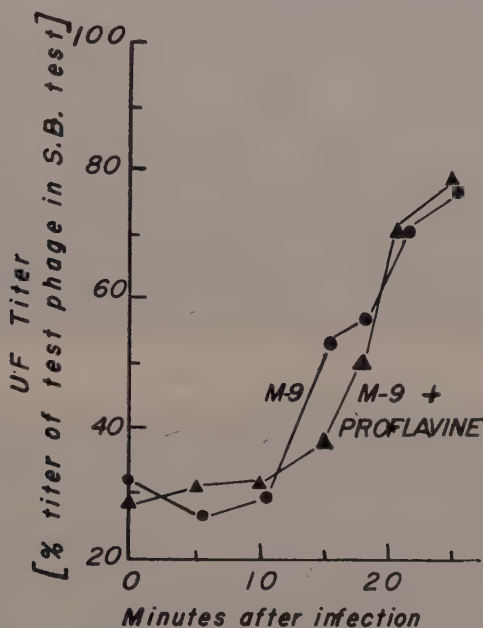


FIG. 2. — The antibody-blocking power of ultrafiltrates of premature lysates. Samples from two cultures of *E. coli* B infected with T2, one containing 3.5 γ /ml proflavine, the other without proflavine, were diluted at intervals into KCN-T6 mixtures. After 1 hour of incubation at 37°, the mixtures received an addition of concentrated nutrient broth and were filtered through gradocol membranes (74 m μ porosity). All samples were tested for blocking power for phage neutralizing antibody (see table I). The values on the ordinate correspond to the percent phage survival (last column in table I).

Instead, ultrafiltrates of proflavine lysates and normal lysates showed similar levels of antibody blocking power (figure 2).

Centrifugation of proflavine lysates. — Centrifugation of proflavine lysates for 1 to 2 hours at 12 000 to 20 000 *g* (after preliminary Mandler filtration or low speed centrifugation) collects a yellowish pellet (presumably colored by proflavine) which resuspends more easily than the bluish, highly refractive pellets of infectious phage. The pellets were resuspended in phosphate buffer (generally M/15 or M/150, with added 10^{-3} M MgSO_4)

and the material was further purified and concentrated by one to three additional cycles of low speed (4 000 g) — high speed centrifugation (12 000 to 20 000 g).

Properties of the concentrated material. — Electron micrographs of the pellet material from proflavine lysates reveals the presence of characteristic particles, shown in figure 3. These are round, collapsible, and morphologically similar to the particles observed in infected bacteria (without proflavine) disrupted late in the eclipse period (Levinthal and Fisher, 1952). They are not found, either in disrupted, noninfected bacteria or in infected bacteria disrupted early in the eclipse period. In electron micrographs prepared by the « critical point » method (Anderson, 1952) the particles appear identical to phage heads in outline, but with a hollow core and either no tail or only a stump of a tail.

Most proflavine lysates also contain at least 1 p. 100 as many tailed particles as tailless ones. These particles are more numerous than the residual titer of active phage. These must be either complete phage particles, inactivated by sojourn in proflavine, or particles liberated in inactive form. Their properties have not been analyzed.

The tailless particles, colloquially called *doughnuts* because of their frequent appearance in electron micrographs as centrally depressed discs, are observed in proflavine lysates of T2, T2r, T5, T6. Other phages have not yet been examined. Most work on the properties of the doughnuts was done with phage T2.

Rate of doughnut formation. — The number of doughnuts in concentrated preparations is generally lower than the number of phage particles in similarly treated active phage preparations. This is probably due to less complete recovery in centrifugation. The best estimate of doughnut number per bacterium is provided by electron microscopic counts done on preparations of prematurely broken bacteria, after low speed centrifugation followed by one centrifugation at 21 000 g. Figure 4 gives the results of such an experiment. Few doughnuts, if any, are present during most of the eclipse period. They appear after about 10 minutes of incubation and increase in number to a total of about 80 doughnuts per cell, a value comparable to the yield of active phage in absence of proflavine. By comparison with the results of Levinthal and Fisher (1952), we see that the doughnuts appear at about the same time in the presence or absence of proflavine, but in the absence of proflavine they are replaced by mature particles, whereas in the presence of the drug they are liberated as such.

The absence of doughnuts during the eclipse period, and their final manifold increase over the input phage, clearly show that

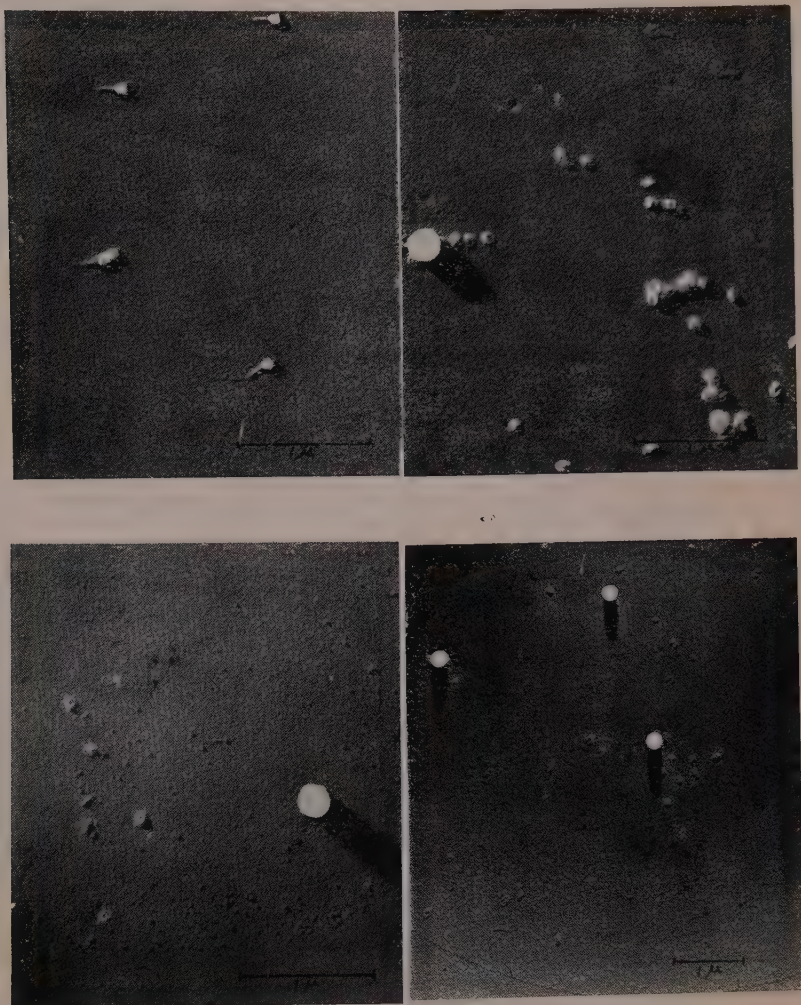


FIG. 3. — Upper left : Purified T2 phage, magnification $\times 32,000$. Upper right : Doughnuts in a lysate prepared with proflavine, magnification $\times 32,000$. Lower left : Doughnuts in a suspension prematurely broken by decompression, magnification $\times 32,000$. Lower right : Portion of a droplet of proflavine doughnuts, magnification $\times 16,000$. The large opaque balls are the polystyrene latex indicator particles. All pictures uranium shadowed.

the doughnuts are not produced by degradation of the infecting phage particles.

Properties of the doughnuts. — 1° *Serological analysis.* — Concentrated preparation of doughnuts fix complement specific-

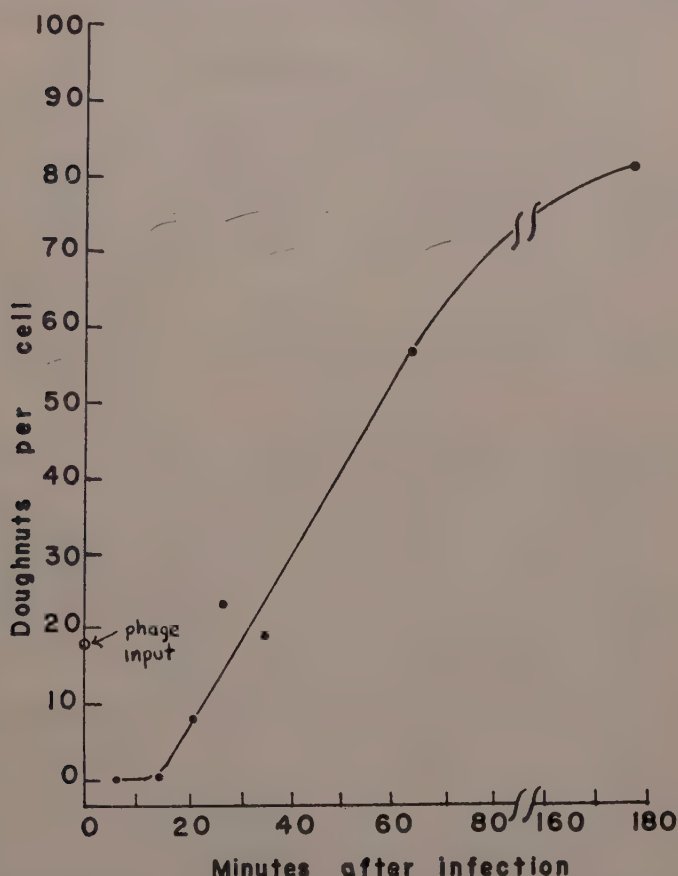


FIG. 4. — Counts of intracellular doughnuts in a proflavine culture. *E. coli* B (10^8 cells/ml) was infected with 18 T2 particles per cell, as determined by electron microscopic count on the infecting phage. At intervals samples were taken, chilled and brought to 800 lbs pressure with nitrous oxide, then decompressed. The material was rechilled and centrifuged at 3,000 *g*, and the supernatant was recentrifuged at 21,000 *g*. The pellets were suspended in distilled water and used for electron microscopic counts. All counts were referred to the initial number of cells.

cally with antiphage serum (table II). The amount of complement fixed per doughnut is about one-half the amount fixed per phage particle.

TABLE II. — Complement fixation by phage
and by proflavine doughnuts with antiphage serum.

Preparations of mature phage or of doughnuts, which had been counted in the electron microscope, were diluted and tested for complement fixation with serum against phage T2 absorbed three times with cells of *E. coli* B.

PHAGE COUNT	PERCENT hemolysis	DOUGHNUT COUNT	PERCENT hemolysis
		8 $\times 10^9$	45
		4 $\times 10^9$	56
2 $\times 10^9$	54	2 $\times 10^9$	80 (1)
1 $\times 10^9$	80 (1)	1 $\times 10^9$	84
5 $\times 10^8$	84	5 $\times 10^8$	88
2,5 $\times 10^8$	84	2,5 $\times 10^8$	90
Control	90		

(1) A sample with 2 $\times 10^9$ doughnuts corresponds to one with 1 $\times 10^9$ phage particles in complement fixing ability.

Instead, doughnuts have apparently no blocking power for phage neutralizing antibody (see table III). The blocking power of a doughnut preparation is of the order expected for the few tailed particles present, assuming these to have the same blocking power as active phage. Precipitation of a doughnut preparation with antiphage serum failed to reduce the phage neutralizing titer of the supernatant, while precipitation of a phage preparation removed the phage neutralizing power completely. This suggests that the antigens that combine with neutralizing antibody are not present or not available in the doughnuts.

2° *Tracer analysis.* — Proflavine and control lysates were prepared in suitable media labeled with either S^{35} or P^{32} . In the S^{35} experiments, the medium was M-9 with the concentration of $MgSO_4$ reduced to 5×10^{-4} M plus 5 to 20 microcuries per ml of carrier-free S^{35} . The P^{32} labeling was done in the « g » medium of Maaløe and Watson (1951) using about 10 microcuries P^{32} per ml. Before infection, the bacteria were grown in labeled medium for a period of several hours (corresponding to 6 generations) to insure maximal labeling. The infecting phage was either labeled or unlabeled.

The doughnuts were collected in the usual way. The first pellets were resuspended in buffer with an excess of unlabeled sulfate or phosphate respectively to dilute any tracer material that could be exchanged with the medium. At least three centrifugation cycles were employed. The results are given in table IV.

The S^{35} content of the doughnuts appears to be at least two-

thirds that of mature phage, while their P^{32} content is not more than one-sixth. Only a portion of the P^{32} activity can be accounted for by the few tailed particles present in the doughnut preparations, even if all the tailed particles contained as much phosphorus as mature phage particles do. Measurements of

TABLE III. — **Combining power for neutralizing antibody; phage and doughnuts.**

A series of mixtures was prepared, containing in a constant volume equal amounts of T2 antiserum and various amounts of purified preparations of either mature phage or doughnuts. The preparations had been counted in the electron microscope. The mature phage preparation had been irradiated with ultraviolet light, a treatment that does not suppress the antibody combining power of the phage. The mixtures were incubated for 4 hours at 48° C. Then, active phage T2r was added, the mixtures were kept for another 4 hours at 48°C and assayed for active T2.

PREPARATION	MIXTURE N°	ABSORBING MATERIAL	PERCENT survival of T2r (test phage)
T2. . . .	1	$7,0 \times 10^9$ phage particles.	84
	2	$3,5 \times 10^9$ — —	61
	3	$1,8 \times 10^9$ — —	41
	4	$0,9 \times 10^9$ — —	18 (1)
P11 . . .	5	$2,8 \times 10^{10}$ doughnuts + $1,0 \times 10^9$ tailed particles.	22 (1)
	6	$9,3 \times 10^9$ — — + $3,3 \times 10^8$ — —	6
	7	$3,1 \times 10^9$ — — + $1,1 \times 10^8$ — —	2,5
	8	$1,6 \times 10^9$ — — + $5,5 \times 10^7$ — —	2,1
P12 . . .	9	$2,1 \times 10^{10}$ — — + $4,2 \times 10^8$ — —	12
	10	7×10^9 — — + $1,4 \times 10^8$ — —	4,1
	11	$2,3 \times 10^9$ — — + $4,7 \times 10^7$ — —	2,1
	12	$1,2 \times 10^9$ — — + $2,4 \times 10^7$ — —	2,0
Control .	13	Nutrient broth.	2,1

(1) By comparison of mixtures N° 4 and 5 it is seen that practically all the serum combining power of the doughnut preparations is accounted for by the few tailed particles.

activity in the supernatants from the centrifugation showed that the amount of free P^{32} in the pellet fraction was negligible. The degree of purity of the preparations is certainly not high; the contribution of impurities to the radioactivity of the doughnut preparations, however, cannot be estimated with any accuracy. The results from tracer analysis are bound to represent maximum estimates of the sulfur and phosphorus contents.

3° *Ultraviolet absorption spectrum.* — Ultraviolet absorption

TABLE IV. — Tracer experiments with phage and doughnuts.

Lysates were prepared with or without 4.0 micrograms per ml of proflavine. For S^{35} labeling the medium was M-9 with the concentration of $MgSO_4$ reduced to 5×10^{-4} M. The P^{32} labeling was done in the "g" medium of Maaloe and Watson (1951). The phage or doughnuts were concentrated and purified by 3 cycles of differential centrifugation. The purified preparations were counted in the electron microscope and tested for radioactivity.

EXPERIMENT	LABEL	LYSATE	ACTIVITY OF MEDIUM (microcurie per ml (2))	ELECTRON MICROSCOPE COUNTS (in 0.1 ml samples)		RADIOACTIVITY				
				Tailed particles	Doughnuts	Counts per minute (in 0.1 ml samples)	Counts per minute per particle (tailed or doughnut)	Ratio: Counts per doughnut Counts per particle	Counts per minute per particle per microcurie of activity in 1 ml of original medium [corrected for decay] (3)	
									Tailed particles	Doughnuts
I (3/29)	S^{35} —	Control. Proflavine.	5 5	4×10^9 [4×10^8] (1)		410 400	2.75×10^{-8} 1.8×10^{-8}	0.66	5.5×10^{-9}	3.6×10^{-9}
III (6/24)	— —	Control. Proflavine.	20 20	5×10^9 (1.3×10^8)	3.4×10^9	563 313	1.1×10^{-7} 8.9×10^{-8}	0.8	5.5×10^{-9}	4.4×10^{-9}
II (6/49)	P^{32} —	Control. Proflavine.	12 12	9.5×10^8 (5×10^7)	1.8×10^9	960 290	1.0×10^{-6} 1.6×10^{-7}	0.16	8.3×10^{-8}	1.3×10^{-8}
III (7/5)	— —	Control. Proflavine.	10 10	1.8×10^9 (1.8×10^8)	5.8×10^9	704 293	3.9×10^{-7} 4.9×10^{-8}	0.13	1.2×10^{-7}	1.5×10^{-8}

(1) The values of tailed particles in proflavine lysates are based on low counts and are less accurate estimates than the other counts.

(2) From data furnished by supplier of isotopes.

(3) The counts in the preceding columns were not corrected for radioactive decay. The data in this column are the only ones to be used for comparison of radioactivity among experiments.

spectra of doughnut preparations (fig. 5) provide a measurement of the concentration of purine and pyrimidine bases. The

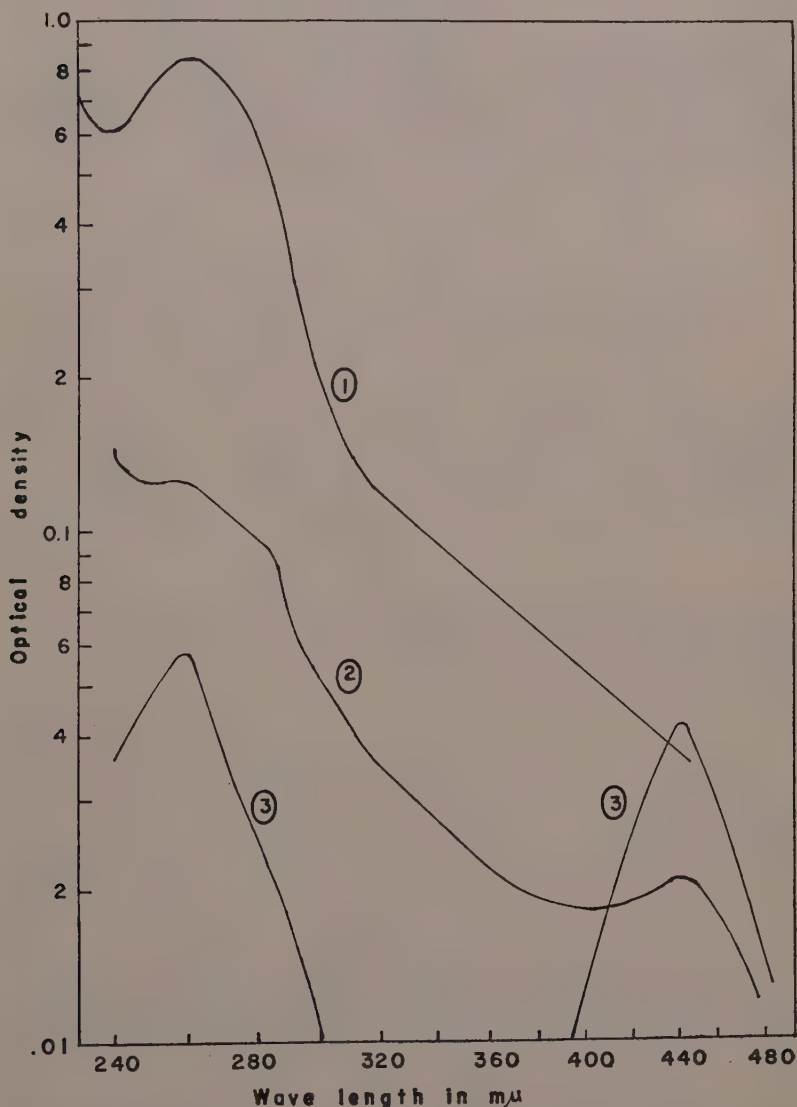


FIG. 5. — Optical density of suspensions of phage T2 (8×10^{10} particles per ml; curve 1), and of proflavine doughnuts T2 (3×10^{11} doughnuts per ml; curve 2) in phosphate buffer. The absorption spectrum of a solution of proflavine in buffer (0.4 γ /ml) is given for comparison with the spectrum of doughnuts. In the region between 3,200 \AA and 3,500 \AA the slope of the curves "log optical density vs. log wave length" is about 3.7 for phage and 4.0 for doughnuts.

TABLE V.

I. — *Adsorption of S³⁵ labeled phage and proflavine doughnuts*

Samples of labeled phage or doughnuts were mixed with *E. coli* B in broth (1×10^9 cells/ml). A sample of each mixture was taken for radioactivity counts. After 10 minutes the mixtures were chilled, centrifuged in the cold for 10 minutes, and samples of the supernatants were taken for activity count. The pellets were resuspended without adding any fluid, the volume was measured, and samples were assayed for activity.

SAMPLE	COUNTS PER MINUTE				APPROXIMATE recovery of activity (pellet + supernatant) total mixture
	Mixture	Supernatant	Pellet	Per cent activity in supernatant	
Phage I	425	20	238	46	83 %
Doughnut I	73	68	94	92	110 %
Phage II	59	15	112	25	81 %
Doughnut II	538	471	541	88	88 %

II. — *Adsorption of proflavine doughnuts.*

A preparation of phage and one of doughnuts were mixed; a sample of the mixture was adsorbed for 15 minutes with *E. coli* B, $1,9 \times 10^9$ cells per ml, then centrifuged for 10 minutes at 3,200 *g* to remove bacteria. Electron microscopic counts were made both on the supernatant from adsorption and on the unadsorbed mixture.

	TAILED PARTICLES	DOUGHNUTS	RATIO (tailed/doughnuts)
Before adsorption . . .	$3,2 \times 10^9$	$6,2 \times 10^9$	0,5
After adsorption	1×10^8	$5,4 \times 10^9$	0,02

III. — *Adsorption of doughnuts obtained by premature lysis without proflavine.*

A mixed preparation of phage and doughnuts, obtained by premature lysis of infected bacteria, was adsorbed for 10 minutes with *E. coli* B, $2,6 \times 10^9$ cells per ml, then centrifuged for 8 minutes at 3,200 *g*. Electron microscopic counts were made on the original preparation and on the supernatant after adsorption.

	TAILED PARTICLES	DOUGHNUTS	RATIO (tailed/doughnuts)
Before adsorption . . .	$2,4 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	0,9
After adsorption	$1,2 \times 10^8$	3×10^9	0,04

absorption at $2\,600\text{ \AA}$ can be used for such measurement, since the molecular extinction coefficient is the same for the bases in the free state and in the phage (Hershey *et al.*, 1951). The absorption at $2\,600\text{ \AA}$ must be corrected for scattering and for proflavine absorption (see fig. 5). Both corrections can be made unambiguously if one assumes that the ratio of proflavine absorption at $2\,600\text{ \AA}$ to that at $4\,400\text{ \AA}$ is not altered by combination with doughnuts. These measurements yield values lower than 20 p. 100 for the ratio of nucleotides in a doughnut and in a phage particle.

4° *Tests for adsorption of doughnuts to sensitive bacteria.* — Doughnuts or phage labeled with S^{35} were mixed with *E. coli* cells. The mixtures were centrifuged, and the radioactivity and the phage titer were measured in the supernatants and in the resuspended sediments. The results, given in table V, show no significant adsorption of the label from the doughnuts.

In agreement with this, electron micrographs of mixtures of doughnuts and active phage, after adsorption with bacteria, gave evidence of a selective removal of the tailed particles from the mixtures (table V). This was observed both with proflavine doughnuts and with doughnuts obtained by premature lysis in the absence of proflavine.

DISCUSSION.

There can hardly be any doubt that the elements described as doughnuts and liberated by bacteria lysed in proflavine medium represent immature phage constituents. They are clearly not artifacts due to proflavine treatment, since similar elements are observed in infected bacteria in the absence of any drug (Levinthal and Fisher, 1952). They are not produced by the drug either from the infecting phage particles or from already mature ones. It seems logical to conclude that the action of proflavine stops phage production at a stage where the doughnuts have been formed but have not yet been transformed into mature particles. This is in agreement with Foster's conclusion (1948) that proflavine prevents one of the terminal stages of active phage production.

What is the place of the doughnuts in phage synthesis? They contain a large proportion of the phage sulfur and little or no phosphorus; they carry some of the phage antigens. These properties relate the doughnuts to the phage skin or « ghosts » (Anderson, 1950; Herriott, 1951; Hershey and Chase, 1952) and this relationship is confirmed by electron microscopy, which shows the resemblance between doughnuts and hollow phage

heads. The doughnuts do not represent full skins, since the skins seem to contain all the sulfur of the phage, while the doughnuts have appreciably less. Also, the doughnuts apparently lack the antigen that combines with neutralizing antibody in antiphage serum. This antigen is present in isolated phage skins (unpublished experiments) and may become evident only when the particles acquire a tail.

Maaløe and Symonds (1952) disrupted S^{35} labeled, T4-infected bacteria during the period when active phage is present and increasing in amount. They purified the phage-containing fraction by differential centrifugation, and found that the material prepared in this way contained an excess of sulfur, over and above the amount accounted for by active phage particles. The excess sulfur-containing material is sedimentable at 10 000 *g*, adsorbable to phage sensitive bacteria, and precipitable by anti-phage serum. This excess of sulfur diminishes steadily as the latent period approaches completion. No similar excess of phage phosphorus is observed (Maaløe and Stent, 1952). This is evidence for the occurrence, during the latent period, of sedimentable phage specific particles, which are noninfectious but host-adsorbable, and which later become transformed into active phage. They are not the doughnuts, since the latter are not adsorbed by bacteria. They probably represent the transition stage between the doughnut and the mature, phosphorus — containing phage which has been observed by Levinthal and Fisher (1952). The doughnuts should appear in Maaløe and Symonds' experiments as a portion of the sulfur that is precipitable but not adsorbable. The doughnut contribution was probably unnoticed by these authors, because of the lower sulfur content of the doughnuts and of their incomplete sedimentation at 10 000 *g*.

Both our experiments and those of Maaløe and coworkers lead us to the conclusion that the various premature phage elements that can be isolated from infected bacteria contain sulfur (= protein) but little or no phosphorus (= nucleic acid) until the very last moments before complete maturation. This is surprising, in view of the evidence that the sulfur proteins of the infecting phage particles play no role in initiating phage reproduction and do not even penetrate the host cell (Hershey and Chase, 1952). One would expect that the nucleic acid-containing phage elements would reproduce and then surround themselves with a sulfur containing skin; yet, little or no phosphorus is found in the recoverable immature forms. Either these are formed separately from the nucleic-acid containing parts and combine with them at the end of maturation, or the two are so loosely combined in the immature forms that release from bacteria causes their separation.

At any rate, proflavine appears to arrest phage production at the doughnut stage, where a tail is not yet present and the nucleic acid not yet firmly attached. The results of Maaløe and Symonds indicate that another stage follows, at which one can detect particles that are still P-free but host-adsorbable, probably with tails.

Proflavine does not prevent lysis of infected bacteria, at variance with other treatments (irradiation; cyanide; 5-methyl-tryptophan), which, when they suppress active phage production, also prevent lysis. This fact suggests that lysis is determined by the same series of events that initiates the process of maturation of which the formation of doughnuts is apparently an early stage.

A process of maturation, as a terminal acquisition of some sort of protective coat after reproduction in an uninfected, unrecognizable state, is apparently not an exclusive peculiarity of the larger T phages, in which it has been described in detail. Suggestive evidence of similar processes is available for several animal viruses (see Andrewes, 1952). The formation of infectious virus particles in polyhedral and capsular diseases of insects and their inclusion into inert embedding materials (Berggold, 1950) may be the equivalent of maturation. In influenza viruses, immature particles endowed with hemagglutinating activity have been recognized (see Gard, 1952). As for plant viruses, an especially interesting analogy is provided by turnip yellow mosaic, in which the virus preparations from infected plants contain almost one-half of their particles in a noninfectious, nucleic acid-free form (Markham, 1952). The infectious particles of this virus contain 35 p. 100 nucleic acid, which is apparently not located on the outside of the particles.

It seems likely that the process of virus maturation may be more vulnerable to chemotherapeutic attack than the other phases of the reproductive cycle of viruses. The latter phases appear to be intimately tied to the metabolic machinery of the cell. Instead, maturation itself is probably an exceptional process for the virus, whose normal state may be that of nonrecognizable provirus (for example, the prophage in lysogenic bacteria). Maturation may involve exceptional mechanisms, not concerned in normal host metabolism. The success of proflavine treatment in arresting phage maturation indicates the desirability of a similar approach to the chemotherapy of other viruses. It also emphasizes the superiority of the tests for antiviral activity which attempt to identify the point of action of a drug in the virus production cycle over those tests that only detect end-effects of the drug on the overall process.

SUMMARY.

Cells of *Escherichia coli*, strain B, infected with phages T2, T6 and T5 and allowed to lyse in the presence of proflavine liberate particles (= « doughnuts »), which resemble in size and morphology the heads of mature phage particles. The T2 doughnuts contain about three quarters as much sulfur per particle as mature T2 particles, but less than one sixth as much phosphorus. They fix complement with antiphage serum, but do not absorb neutralizing antibody. In the presence of proflavine, the doughnuts appear inside the infected bacteria at about the same time as do similar particles in the absence of the dye, but fail to be replaced by mature particles. It is concluded that the doughnuts represent an incomplete stage of maturation of phage particles, although their properties in the extracellular state may not be fully representative of those of the native, intracellular particles.

REFERENCES

- M. H. ADAMS. *Methods in Medical Research*, 1950, **2**, 1.
 T. F. ANDERSON. *J. Appl. Physics*, 1950, **21**, 70.
 T. F. ANDERSON. This Symposium, 1952.
 C. H. ANDREWES. *Proceed. Roy. Soc. London, B*, 1952, **439**, 313.
 R. C. BACKUS and R. C. WILLIAMS. *J. Appl. Physics*, 1950, **21**, 11.
 G. H. BERGOLD. *Can. J. Res., E*, 1950, **28**, 5.
 F. M. BURNET. *Brit. J. exp. Path.*, 1933, **14**, 100.
 A. H. DOERMANN. *Feder. Proc.*, 1951, **10**, 591.
 A. H. DOERMANN. *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 645.
 R. A. C. FOSTER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 795.
 D. FRASER. *Nature*, 1951, **167**, 33.
 S. GARD. *Soc. Gen. Microb. Symp. on Virus Multiplication*, 1952 (in press).
 F. HERCIK. *Casopisu Lekaru Ceskych.*, 1950, **89**, 91.
 R. M. HERRIOTT. *J. Bact.*, 1951, **61**, 752.
 A. D. HERSHEY and M. CHASE. *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 39.
 A. D. HERSHEY, M. D. KAMEN, J. W. KENNEDY and H. GEST. *J. gen. Physiol.*, 1951, **34**, 305.
 E. A. KABAT and M. M. MAYER. *Experimental immunochemistry*, 1948. C. C. Thomas, Springfield, Illinois.
 C. LEVINTHAL and H. FISHER. *Bioch. Bioph. Acta*, 1952, **9**, 597.
 S. E. LURIA. *Cold Spring Harbor Symp.*, 1951, **16**, 463.
 S. E. LURIA, R. C. WILLIAMS and R. C. BACKUS. *J. Bact.*, 1951, **61**, 179.
 O. MAALÖE and G. S. STENT. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1952, **30**, 149.
 O. MAALÖE and N. SYMONDS. *J. Bact.*, 1952 (in press).
 O. MAALÖE and J. D. WATSON. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1951, **37**, 507.
 R. MARKHAM. *Soc. Gen. Microb. Symp. on Virus Multiplication*, 1952 (in press).

THE ORIGIN OF THE COMPONENTS OF THE BACTERIOPHAGE PARTICLE (1)

by E. A. EVANS Jr.

*(Department of Biochemistry, University of Chicago,
Chicago, Illinois.)*

Our present information in regard to coliphage synthesis can be separated into a number of succeeding phases, some of which can be isolated for experimental study. The initial adsorption of the infecting particle to the bacterial host involves a reversible union between the two reactants which is a function not only of their surface configuration, but requires the presence of a specific ionic medium [1] and, in certain cases, of such organic substances as tryptophan or other amino acids [2]. This reversible phase is succeeded by an irreversible period during which it is impossible to remove the adsorbed phage from the bacterial surface. Almost instantaneously, there occurs a fragmentation or splitting of the infecting particle with a portion of the nucleic acid of the parent virus particle being released into the medium. It is clear, then, why (various) investigators failed to find phage particles in the early stages of infection, since the isotopic studies clearly demonstrate that loss of the physical integrity of the infecting particle occurs early in the process of coliphage synthesis. It is possible that the primary interaction between the host and the intact infecting particle is an indispensable feature of virus reproduction, and that the synthesis of viral progeny identical with the parent particle is pre-ordained in this reaction. It seems more probable, however, that the primary stage of the adsorption process represents a mechanism for introducing an effective portion of the virus into the cellular medium necessary for virus propagation. Under these circumstances, that portion of the virus appearing in the medium during the fragmentation stage represents discarded fragments of the machinery of adsorp-

(1) The original experiments included in this report were supported by grants from The National Foundation for Infantile Paralysis, Inc., and from the Dr. Wallace C. and Clara A. Abbott Memorial Fund of the University of Chicago.

tion or penetration, and only a portion of the parent particle is involved in directing or participating in the further reactions which lead to the replication of the original infecting particle. Virus replication, then, would not involve a direct copying from the original particle by a process of point to point duplication, nor does it seem probable, at least to me, that the effective portion of the parent virus particle would be capable of fashioning a template for the replication of the whole virus particles. Rather — and the results of our biochemical studies lead to the same conclusion — the effective portion of the parent particle directs or modifies the metabolic machinery of the host for the synthesis of viral progeny.

Following the fragmentation of the parent particle the host cell undergoes transformations which are still only partially understood. The chromatinic bodies of the bacterial host undergo a series of changes and the cells become enlarged and swollen [3]. The oxygen uptake is unchanged but Cohen has shown [4] that the metabolism of both the phospholipid and the RNA fraction appears to cease inasmuch as these constituents of the host cell show no further incorporation of radioactive phosphate after infection. More recently, Dr. Koch in our laboratory [5] has confirmed this by showing that the adenine and guanine of the RNA of the infected cell are, like the phosphorus, inert after infection. However, the DNA content increases and it is possible that the total quantity of DNA formed in the infected system is larger than that eventually found in the viral progeny. In any case, with T_6 and the other tailed coliphages, there is insufficient bacterial DNA to supply that required by the virus and a synthesis of considerable quantities of viral DNA from the components of the medium takes place. This involves, of course, an increased synthesis of desoxypentose, and Cohen, in an elegant series of experiments, has shown that this is effected by an alteration in the normal carbohydrate metabolism of the bacterial cell [6]. In the normal growing cell, ribose is formed by direct oxidation of glucose while desoxypentose is derived from the condensation of acetaldehyde with triosephosphate originating from glucose by way of the anerobic mechanisms of the Meyerhoff-Embden scheme. The triose may also be formed by the oxidation of ribosephosphate. In the infected bacterial cell, however (using coliphage T_6) the oxidative path is apparently sharply diminished and large quantities of hexosephosphate are converted into the necessary desoxypentose by way of the anerobic mechanism.

It is apparent that other metabolic changes must also occur, but these are still unknown. Certainly protein is synthesized at a time somewhat earlier than the observable increase in

DNA [4] and the enzymic spectrum of the infected cell changes. Pardee [7] has shown that the ATPase and DNAase content of the infected cells are greatly increased. Dr. Kozloff [8] has confirmed the observation regarding DNAase, and has made the additional interesting discovery that the normal bacterial cell apparently contains a specific inhibitor for the DNAase of the infected cell.

By artificial lysis of the infected cell, one can demonstrate — by serological and other means — the presence of forms which appear to be immature or incompletely synthesized virus particles. These persist even when lysis is permitted to occur in the normal fashion and there seems to be no direct relation between termination of virus synthesis and the time at which the cell undergoes lysis.

From a chemical standpoint, coliphages are composed of about half nucleic acid of the DNA type and half protein, together with small quantities of RNA and ether-soluble lipid material. The DNA composition of the phage differs from that of the bacterial host; in T_6 the virus contains relatively larger amounts of adenine than of guanine in contrast to the reverse situation in the bacterial cell, while the thymine content of the phage DNA is relatively higher than that of the host, the cytosine being about the same. The amino acid composition of the protein portion of the virus differs also from that of the host. In neither case, however, are these differences striking, although it is clear that any direct utilization of bacterial DNA or of bacterial protein for viral synthesis would require a reshuffling of the component parts of these two fractions.

From this outline of the process of viral reproduction, it is clear that the effective portion of the virus particle may be involved in the process of viral reproduction so that: 1) portions of its actual physical substance are transmitted to the viral offspring, or 2) that the effective portion of the parent particle may direct viral replication without any direct transfer of its own substance, or that 3) some combination of these two processes may be taking place. In the same fashion, new virus can be manufactured: 1) exclusively from the constituents of the host cell, or 2) the host cell may simply supply the machinery for the synthesis of new viral particles from the materials of the environment, or 3) again, some combination of the two processes may occur.

Let me speak first with reference to the transfer of material from the parent particle — and here I shall be brief since Dr. Hershey will discuss the matter in more detail. It is evident that small quantities of the nucleic acid of the parent particle do appear in the viral progeny. However, it seems that the

process is non-specific and the appearance of a portion of the labeled material of the original particle in the progeny represents merely a utilization of material conveniently available for synthesis. Even smaller quantities of the protein part of the parent particle are carried over to the viral progeny, and it is possible that these may represent impurities in the purified phage preparations. If one assumes that our technical methods are too gross to detect a specific transfer, it is still possible to define, very approximately, its upper limits. Kozloff [9] has calculated that in the case of T_6 less than 0.1 p. 100 of the total nucleoprotein of each of the progeny could originate from the parent, assuming 150 progeny per parent particle and the transfer of 15 p. 100 of parent material. Since the existence of non-specific transfer on a large scale can be demonstrated, the limit figure is more probably around 0.01 p. 100. If the molecular weight of the nucleic acid portion of T_6 is around 80 000 000 then this would permit the possibility of a fragment of 80 000 being transmitted. A recent estimate by Srb and Owen [10] suggests that the upper size limit of the average gene is comparable to that of a cylinder 20 m μ in diameter and 100 m μ long, in other words, comparable in size to the whole of one of the tailed coliphage particles, and much greater than the estimated figure for transmitted parent material.

If we turn to a consideration of the contribution of host materials to the viral progeny, we find evidence of a process of considerable magnitude although one of uncertain physiological significance. However, it seems improbable that in any circumstance the materials of the host are able to serve entirely as sources of virus growth, inasmuch as viral reproduction does not occur if nutrient materials are not present in the medium. Bacterial growth does not appear to be an obligate factor for viral reproduction in itself, since cells irradiated to the point of failure to grow are still capable of producing bacteriophage. What is probably indispensable is part of the metabolic machinery of the host cell.

Without the use of isotopes, it would be difficult, if not impossible, to determine the origin of the various components of the virus particle, and perhaps the most important contribution of this technique to the phage problem has been to give us some idea of the nature of the process. The first experiments of this sort, using P^{32} in the medium, were carried out by Seymour Cohen in 1948 [4] using T_2 and T_4 as the coliphages. He found that large quantities of the phosphorus of the medium were transferred to the viral offspring. In view of the failure of the phosphorus of the RNA to exchange, Cohen suggested that the small amount of viral material derived from the host originated

in the acid soluble fraction of the bacterial cell. Kozloff and Putnam [41] carried out similar experiments with T_6 but on the basis of experiments using cells differentially labeled in the phosphate fraction, suggested that bacterial DNA was the principal source of the host material appearing in the DNA of the viral progeny. However, these experiments were not conclusive, and it has required some additional three years, together with experiments using N^{15} and host cells specifically labeled with purines and pyrimidines containing radioactive C^{14} as well as with P^{32} to establish the fact that the bulk of the material contributed to the DNA of the viral progeny by the host cell originates from the bacterial DNA fraction, although small quantities of the viral nucleoprotein are also derived from both the protein and acid soluble components of the bacterial cell.

Before considering the evidence supporting the transfer of bacterial DNA to virus it is desirable to dispose of the data concerning the contribution of other components of the bacterial cell to viral DNA. Most of our evidence concerning this point comes from work with the T_6r^+ strain of phage. So far as the acid soluble material of the bacteria is concerned, experiments of Kozloff and Putnam [41] and of Siddiqi [42] indicate that no major contribution occurs from this fraction. Cohen [4] has shown that the metabolism of RNA and phospholipid in the infected cell comes to a stop and these materials cannot participate, therefore, in the manufacture of viral DNA. Also, Siddiqi [42] has presented evidence that bacterial protein is not a major source for viral DNA so that one is left with the conclusion that in the case of T_6r^+ (and presumably the other phages of this group) the major portion of the viral DNA must be derived from the DNA of the host or synthesized from the simple constituents of the medium.

I should like to turn then to the arguments supporting a transfer of bacterial DNA to virus. To begin with, such a transfer can be demonstrated qualitatively by experiments in which only the purines or the pyrimidines of the host cell are labeled with isotopic C^{14} . In each case, one can show that the labeled base is transmitted to the viral progeny. From a quantitative standpoint, one can conclude that this is the major aspect of host contribution by comparing the magnitude of the host contribution in experiments in which all of the nitrogenous components of the host are labeled with N^{15} to experiments in which only the adenine and guanine of the host are labeled. Such evidence is most convincing in experiments carried out by Dr. Koch using a double labeled bacterial host cell. By growing *E. coli* in a medium containing radioactive purines, it is found that these are incorporated directly and exclusively into the

purines of the nucleic acid fraction. It is possible, then, by growing bacteria on a medium containing $N^{15}H_4Cl$ and large quantities of radioactive adenine free of N^{15} to obtain bacteria in which all the purines have been derived from the adenine of the medium. As shown in Table I, under these circumstances less

TABLE I. — The Non-utilization of Host Sources Other than Purines for the Synthesis of Phage Purines and the Non-lability of Host Purine Amino Groups during the Conversion to Phage Purines (1).

	N^{15} (2) <i>Atom per cent excess</i>			C^{14} (3)
	Total Material	Ring	Amino Group	Relative specific activity
BACTERIA :				
Guanine		> 1	36,5	100
Adenine		$> 0,5$	3,5-4,0	100
Uracil	51,5			
Protein.	35			
PHAGE :				
Guanine		> 1	12,2	34,6
Adenine		$> 0,5$	0,8-1,4	23,5
Thymine	45,1			
Protein.	3,3			

(1) The bacteria were grown in a synthetic lactate medium containing 750 mg $N^{15}H_4Cl$, 62 atom per cent excess, and 201 mg of 8- C^{14} adenine containing no N^{15} and counting $8,0 \times 10^3$ c. p. m. per μM as an infinitely thin sample.

(2) All samples were diluted for mass spectrometer analysis, and consequently the accuracy for the ring nitrogens in particular is not very great. However, the actual value is certainly within the limits given. For values not otherwise qualified the accuracy is ± 5 per cent. All determinations were done in duplicate.

(3) Values given are relative to the specific activity of the adenine in the bacterial growth medium, and are accurate to ± 3 per cent.

than 1 and 2 p. 100 respectively of the nitrogen atoms in the ring of adenine and guanine have been derived from the $N^{15}H_4Cl$ of the medium. On the other hand, the amino group of the purines has picked up N^{15} and approximately 60 p. 100 of the amino group of guanine and 6 p. 100 of the amino group of adenine has been derived from the N^{15} of the medium. So far as radioactive carbon is concerned, this is present exclusively in the ring carbons of the two purines. When these doubly labeled cells are infected with T_6r^+ and the resulting phage harvested and purified, the isotope distribution is that shown in the table. In terms of guanine and adenine transfer, 34.6 p. 100 and 23.5 p. 100 respectively of the phage purines have originated from the bacterial host and it follows that considerable amounts of these substances must

have been synthesized from the unlabeled materials of the medium. Further, it appears that the purines are transferred intact from host to phage, inasmuch as the amino groups are transferred unchanged, i.e., you can see that the N^{15} of the amino group of both adenine and guanine was diluted by new synthesis during the course of phage growth to the same extent as the C^{14} of the ring. In the case of guanine, for example, in which accurate N^{15} determinations were obtained, the atom per cent excess of the amino group of phage guanine was 33.4 p. 100 that of the corresponding group of the host, while the relative radioactivity of the phage guanine was 34.6 p. 100. You will see also that the purine rings of the phage contain very little N^{15} , although the C^{14} specific activity was greatly reduced. Since the non-purine nitrogenous components of the bacterial cell had contained at least 50 atom p. 100 excess N^{15} , it is clear that no non-purine nitrogenous component present in the cell at the time of infection is converted to phage purines. Since we can exclude the participation of RNA in the process, and since the amount of acid soluble adenine (there is essentially no acid soluble guanine in the bacterial cell) could supply only 20-30 p. 100 of the host contribution, it appears that the acid soluble compounds of the host do not contribute significantly to the phage nucleic acid. It seems clear, then, that host purines are utilized intact with respect to the labeled ring carbon of the labeled amino groups for the synthesis of viral DNA and that despite intensive purine synthesis there is no other host nitrogenous source of virus adenine and guanine.

Weed and Cohen [13] have demonstrated a direct transfer of the pyrimidines of the viral nucleic acid by growing bacteria in the presence of a pyrimidine precursor. Under these circumstances, one obtains a bacterial host in which the pyrimidines of RNA, that is uracil and cytosine, and the purines of DNA, thymine and cytosine, were exclusively labeled. Phage grown on such cells contained considerable quantities of host pyrimidines (thymine and cytosine) while both the purine and carbohydrate components of the phage were free of radioactivity. It is clear, then, that host pyrimidines are transferred to the viral progeny. Further support for the transfer can be derived from experiments in which host cells uniformly labeled with N^{15} were used. Here, isotopic nitrogen is found at the same concentration in both the purines and the pyrimidines of the viral nucleic acid. This is also observed in the particular case of thymine which is present only in the DNA fraction of the bacterial nucleic acid.

Finally, recent experiments with T_7 also support this view [14]. Fig. 1 shows an experiment in which unlabeled bacterial cells were infected in nutrient saline medium containing P^{32} . After

a latent period of 40 minutes a sharp rise in phage titer and light transmission occurred, ending at 70 minutes. All phosphorus fractions of the bacterial cell show a small increase in isotope concentration due probably to poor initial adsorption, incomplete infection, and some bacterial growth. The DNA frac-

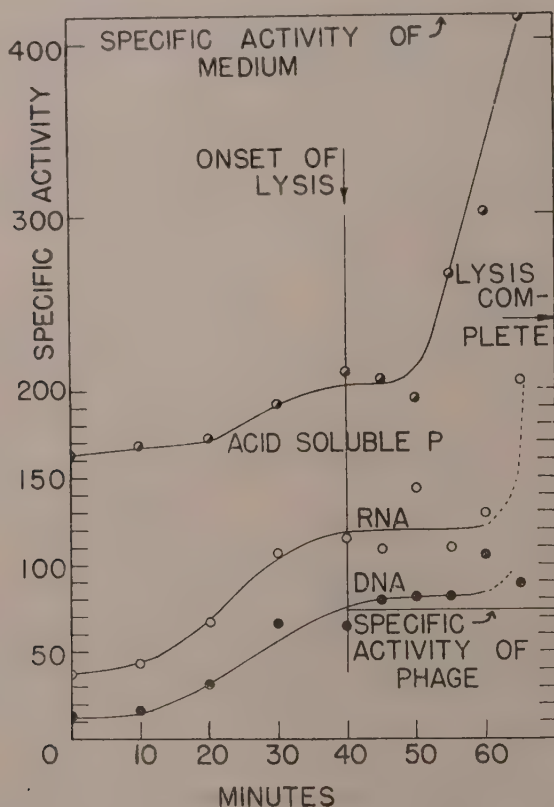


FIG. 4. — Uptake of radioactive phosphate by *E. coli* infected with T₇ bacteriophage. The units are specific activity (c. p. m. per γ P).

tion (consisting of bacterial DNA and the DNA of unliberated virus) had the lowest specific radioactivity at the time of lysis. The specific activity of the isolated virus was two-thirds that of the bacterial RNA and approximately equal to that of the DNA fraction, supporting the view that virus DNA arises from bacterial DNA rather than from the acid soluble phosphorus compounds present at infection.

These arguments establish, I believe, the fact that the transfer

of the bacterial DNA to the virus is a characteristic feature of the bacteriophage system.

Since host and viral DNA differ in composition (bacterial DNA containing slightly more guanine than adenine, while the virus DNA contains much more adenine than guanine), the transfer must involve fundamental rearrangements and alterations. However, the differences in composition could result from the transfer of large polynucleotide units of bacterial nucleic acid coupled with the synthesis, in varying amounts, of one or another component of the viral nucleic acid from the materials of the medium. If a direct transfer of intact nucleic acid from bacteria to virus occurs, one would expect that the ratio of per cent virus nucleic acid nitrogen derived from the host to per cent virus nucleic acid phosphorus derived from the host would be unity. In experiments in which the host bacteria were labeled with both isotopic nitrogen and radioactive phosphorus, the observed ratio is from 1.3 to 1.4. Evidently, then, some alteration of bacterial nucleic acid must occur. However, the fact that nitrogen and phosphorus are simultaneously transmitted might suggest that at least nucleotide units are involved. Also the observation that the addition of free purines to the medium is without effect on the transfer although the normal bacteria utilizes such purines, suggests that more complex units than the simple bases are being transferred. A similar conclusion arises from experiments in which only the adenine and guanine of the host cells carry isotopic labels [15]. If we compare the ratio of isotopic activity of guanine to that of adenine in the host, with the same ratio from the virus, one sees that relatively more guanine than adenine of the host cell is used for phage synthesis. This association in the transfer of adenine and guanine from the virus would seem to favor the hypothesis that bacterial DNA is chemically degraded to oligonucleotides or mononucleotides before its utilization for phage synthesis.

Dr. Koch has calculated the percentage of the purines transferred to find that approximately 100 p. 100 of the adenine of the bacterial DNA and 75 p. 100 of the guanine of the bacterial DNA are used for phage synthesis [15], and a transfer of similar magnitude emerges from a consideration of the lengthy series of experiments in which host cells were uniformly labeled with N^{15} [16].

While transfer of bacterial DNA to phage occurs with both T_6r^+ and T_7 , there are quantitative differences in the two cases which deserve further comment. Some recent experiments with this phage, acting on bacteria labeled with P^{32} and N^{15} are to the point. In mass cultures on synthetic medium, total lysis occurs with T_7 in 40-60 minutes. Since the specific activity

of the acid soluble phosphorus of the bacterial cell changes rapidly when labeled bacteria are suspended in unlabeled medium, the experiments were carried out so as to measure the specific activity of the various fractions of bacterial phosphorus at zero time, i.e., at the moment of suspension in the unlabeled medium and at intervals prior to lysis (table II).

TABLE II. — Origin of the P and N of *E. coli* Bacteriophage T₇.

	INITIAL Bacteria	ISOTOPE ACTIVITY (Bacteria at 10 min. or Final Virus)				
		Whole	Acid- soluble	RNA	DNA	Protein
P ³² c. p. m./P.						
Virus.	778	440	115	425	475	355
Bacteria			332	505	540	500
Ratio					0,88	0,71
N ¹⁵ Atom Per Cent Excess.						
Virus.	9,90	5,74	1,85	3,62	6,53	3,75
Bacteria			5,72	8,14	8,15	8,33
Ratio			0,69		0,80	0,45

As you see, the specific activity of the virus phosphorus was invariably greater than that of the bacterial acid-soluble phosphorus prior to lysis, thus excluding the possibility that much or all of the viral phosphorus (which is, of course, nucleic acid phosphorus) originated in the low molecular weight compounds of the acid-soluble phosphorus fraction. Moreover, the specific activity of the viral phosphorus was 59 p. 100 that of the remaining phosphorus fractions of the host, indicating that all, or nearly all, of the viral phosphorus came from host nucleic acid (since bacterial phospholipid phosphorus can be excluded on other grounds). In marked contrast to T₆, all, or nearly all, of the viral phosphorus is derived from the bacterial host, and utilization of medium phosphorus for viral DNA synthesis is small. The nitrogen figures confirm this and also demonstrate a larger transfer of isotope from host to viral DNA than from host to viral protein. With T₆ then, with insufficient host DNA to account for viral DNA, extensive utilization of the components of the medium takes place; with T₇ in which there is enough

host DNA to supply the total DNA requirement of the viral progeny, little utilization of the medium occurs.

This leads to the question as to whether there is anything unique about this contribution of bacterial DNA to viral progeny. It is still uncertain whether we are concerned here with a type of specific and obligate transfer of host DNA to viral progeny or whether the fact that the particular molecules of bacterial DNA appear in the viral progeny indicates merely that host DNA serves as a convenient and readily available chemical « bone-pile » from which materials can be abstracted for the replication of the viral particle. The latter view is supported by the experiments of Weed and Cohen [43]. As I have previously mentioned, these investigators have infected bacteria in which the pyrimidines of the nucleic acid were labeled with C^{14} , with T_6r+ and T_6r (the slow « lysis-inhibited » strain and its one step mutant, a rapid lysing strain). They analyzed the progeny obtained after normal lysis as well as phage obtained by premature lysis of the infected cells with sodium cyanide. It was found that the thymidylic and desoxycytidylic acids of the virus derived from the early-lysing T_6r cells and the prematurely lysed T_6r+ cells contained about four times the isotopic concentration of the pyrimidines present in the virus derived from the cells infected with T_6r+ when lysis was delayed and the yield of virus greater. Weed and Cohen concluded, therefore, that the virus particles synthesized in the earlier stages of viral reproduction contain the whole of the pyrimidines derived from the host and that the later particles are composed of material derived from the medium. These experiments, while indicating that pyrimidines, like purines, are transferred intact from host to virus and also that host DNA, is a precursor of viral DNA, disaffirm the concept of a specific material host contribution to each virus particle. Dr. Kozloff has carried out similar experiments, using bacterial cells uniformly labeled with N^{15} . He has infected such cells with T_6r+ and compared the p. 100 of isotope in the virus obtained by premature lysis with NaCN with that of virus from normal lysis, to find also that the particles formed during early lysis contain more of the host isotope than do those produced at the end, although the differences are less pronounced than in the experiments of Weed and Cohen.

These data are difficult to reconcile with our own earlier experiments with T_6r+ , in which as lysis proceeded, successive batches of phage were harvested, purified, and examined for isotope content [46]. As Table III shows, the isotopic content of the DNA of phage liberated at different times during lysis remains relatively constant. The level of isotope incorporation varies from experiment to experiment, but in a single experiment the

TABLE III. — Kinetic Study of the Sources of Virus Nitrogen.

	PER CENT OF N DERIVED FROM HOST (1)					
	Experiment I			Experiment II		
	Incubation Time (Hours)					
	5,5	7	4	3	5	24
Total phage N	24,9	26,9	25,9	38,3	31,1	26,3
Phage nucleic acid N . . .	37,1	38,1	37,9	42,7	43,2	38,2
Phage protein N	17,6	17,4	11,0	26,6	12,7	10,5

(1) Atom per cent excess N^{15} in virus N \div Atom per cent excess N^{15} in bacteria prior to infection $\times 100$.

level remains the same, irrespective of the time of release of the phage particles. This suggested to us the important possibility that the transfer of bacterial DNA to viral progeny involves a donation of individual fragments, possibly identical, of bacterial DNA to each virus particle synthesized. The mechanism of virus replication would be such, then, that each virus particle receives a fragment of the DNA of the host from which it is derived.

One might suggest that it would be possible to explain the results of such experiments on other grounds. If we assumed that, in our suspension of infected cells, bacteriophage synthesis had occurred in each cell at the same rate and to the same extent, and that lysis then occurred independently, liberating preformed phage at varying intervals, one would expect that the p. 100 incorporation of host DNA nitrogen would remain the same for phage released over the whole course of the lysis period. However, if we compare the figures for isotope contribution to viral DNA with those for isotope contribution to viral protein, we see that the latter fall off rapidly with increasing time. If we were concerned with a process by which simultaneously synthesized virus particles were gradually released over a period of time, one would expect to find the protein N exhibiting the same constancy with regard to host isotope contribution as does the DNA. I have already mentioned the fact that Cohen has shown that viral protein synthesis apparently precedes that of viral DNA. It seems hardly likely that bacteriophage protein, once synthesized and awaiting release by lysis, would exchange with the nitrogen of the cell or medium while the nucleic acid component of the phage remained inert.

Experiments of Labaw [47] are also pertinent to this question.

Figure 2 is from a recent paper by this investigator. In this you will see that he finds that the host contribution of phosphorus to viral progeny is roughly the same for all the coliphages he has examined. That is the absolute amount of virus phosphorus (i.e., DNA) derived from the host in the case of T_{6r+} is about the same as that in the case of T_7 , although in the one case the

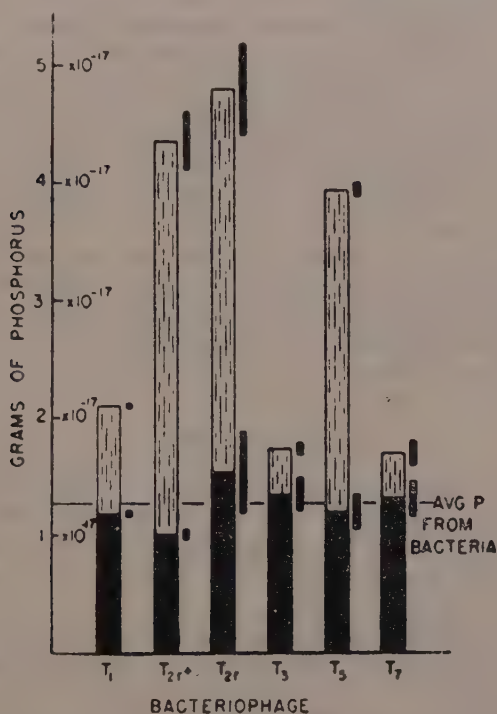


FIG. 2. — A bar graph of the total phosphorus per lytic unit with the virus phosphorus from the host bacteria superimposed (the narrow bars to the right of the main ones represent the mean deviation in the average values plotted).

viral DNA is supplemented by a considerable amount of material synthesized from the medium, while in the other practically all the viral DNA comes from the host.

It is not possible to arrive at any certain conclusions from these experiments, and it is clear that further experimentation will be required to establish the physiological significance of DNA transfer. However, it should be pointed out that in the experiments with N^{15} , one is following essentially the transfer of the purine portions of the bacterial DNA; while in experiments

with marked pyrimidines and with radioactive phosphorus, these portions of the bacterial DNA are being traced. It is quite possible that the varying results derived from the use of different isotopic labels reflect the fact that the purines and pyrimidines of the bacterial host are used at different rates and in different fashions in the manufacture of viral DNA.

It seems certain that our further understanding of the biochemical aspects of bacteriophage synthesis will involve some understanding of the normal nucleic acid metabolism of the bacterial cell. Certainly, any theory of the mechanism of phage reproduction must account for the two salient facts which have emerged from a biochemical study of the bacteriophage system. These are : 1) the fragmentation of the infecting particle in the infectious process, with the inference that the effective agent in the intracellular phase of virus synthesis is not identical with the virus particles being formed ; and 2) the apparent non-specific utilization of the materials of the host and of the parent-particle, with the implication that (except for the possible case of host DNA) the essential feature of phage reproduction is a replication of form and not substance.

BIBLIOGRAPHY

- [1] T. T. PUCK, A. GAREN and J. CLINE. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 65. — A. GAREN and T. T. PUCK. *J. exp. Med.*, 1951, **94**, 177.
- [2] T. F. ANDERSON. *J. Cell comp. Physiol.*, 1945, **25**, 17.
- [3] J. S. K. BOYD. *Nature*, 1949, **164**, 874.
- [4] S. S. COHEN. *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 281.
- [5] A. KOCH. Unpublished results.
- [6] S. S. COHEN. *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 131.
- [7] A. B. PARDEE and I. WILLIAMS. *Arch. Biochem. and Biophysics* (in press).
- [8] L. M. KOZLOFF. Unpublished results.
- [9] L. M. KOZLOFF. *J. biol. Chem.*, 1952, **194**, 95.
- [10] A. M. SRB and R. D. OWEN. *General Genetics*, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1952.
- [11] L. M. KOZLOFF and F. W. PUTNAM. *J. biol. Chem.*, 1950, **182**, 229.
- [12] M. S. H. SIDDIQI, L. M. KOZLOFF, F. W. PUTNAM and E. A. EVANS JR. *J. biol. Chem.*, 1952, **199**, 165.
- [13] L. L. WEED and S. S. COHEN. *J. biol. Chem.*, 1951, **192**, 693.
- [14] F. W. PUTNAM, D. MILLER, L. PALM and E. A. EVANS JR. *J. biol. Chem.*, 1952, **199**, 177.
- [15] A. L. KOCH, F. W. PUTNAM and E. A. EVANS JR. *J. biol. chem.* 1952, **197**, 105.
- [16] L. M. KOZLOFF, K. KNOWLTON, F. W. PUTNAM and E. A. EVANS JR. *J. biol. Chem.*, 1951, **188**, 101.
- [17] L. W. LABAW. *J. Bact.*, 1951, **62**, 169.

THE BASES OF THE DEOXYRIBONUCLEIC ACIDS OF T2, T4, AND T6 BACTERIOPHAGES

by G. R. WYATT, and SEYMOUR S. COHEN (1).

(The Laboratory of Insect Pathology, Sault Ste. Marie, Ontario,
and the Department of Pediatrics
and the Department of Physiological Chemistry,
University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa.)

In correlating the possible specificity of deoxyribonucleic acids (DNA) with chemical structure, it is of interest to compare the nucleic acids of genetically related and unrelated viruses. This has been studied by analysing the base compositions of the genetically related *r* and *r*⁺ strains of T2, T4, and T6 bacteriophages. The T2, T4, and T6 viruses are serologically related and may be considered to be genetically more distantly related than the one-step mutants, *r* and *r*⁺, within each group. Chemical and metabolic properties of these viruses have been described [1, 2].

Conflicting data have appeared on the base composition of these viruses. Uracil has not been observed, confirming the absence of ribose nucleic acid. Adenine, guanine, and thymine have been found without any difficulty. Cytosine, however, although present in *E. coli*, was not found in analyses of T2 and T4 in which the ratio of recovered bases to P was low (ca. 0.7) [3, 4]. However, other workers reported the presence of cytosine in T2 [5], and its deoxyribonucleotide in T6 [6]. These discrepancies now appear to be resolved by the discovery of a new base in T2, T4, and T6, which closely resembles cytosine, for which it was previously mistaken. The new base is quite labile, and for this reason, it was not found by other investigators. The new base will be referred to as C_x, since its structure, although suspected, has not yet been determined (2).

Perchloric acid hydrolysis of phage or phage DNA largely

(1) The work of one investigator (S. S. C.) was conducted under a grant from the Commonwealth Fund.

(2) Note added in proof. C_x has been identified as 5-hydroxymethylcytosine.

destroys C_x under conditions in which base recovery from thymus or rickettsial DNA is 96-100 p. 100. Destruction of C_x is minimized by the use of 88 p. 100 formic acid at 175° for 30 minutes. The recovery of C_x from intact phage is slightly better than that from isolated DNA. Formic acid hydrolysis of whole viruses followed by paper chromatography of the bases [7] has led to the analyses presented in table I. Among possible reasons for the

TABLE I. — **Base composition of virus DNA**
(moles p. 100 moles total nucleotide).

	T2r +	T4r +	T6r +
Adenine	33,6	33,0	33,6
Guanine	18,1	18,3	18,0
Thymine	35,6	36,0	36,0
C_x	12,7	12,5	12,3
Cytosine	0	0	0
5-methyl cytosine	0	0	0
Ratio $\frac{\text{base recovery}}{P}$	0,90	0,90	0,91

relatively low base recovery, equivalent to about 90 p. 100 of the P content, are 1) the lability of C_x , and 2) the use of the molecular extinction coefficient of cytosine for C_x which may prove to be unjustified.

Repeated analyses have failed to reveal significant differences between the r and $r+$ mutants nor indeed among the 6 viruses. Although these results show an apparent similarity of the 6 nucleic acids in 6 genetically distinct viruses, numerous possibilities remain of isomeric and population differences not demonstrable by the analytical methods now in use.

C_x has properties very similar to cytosine but may be separated from it by paper chromatography. In figure 1, it can be seen that in isopropanol-water mixtures, C_x has a higher R_f value than cytosine in solvents rich in water, and a lower R_f value than cytosine in those of low water content. This hydrophilic property also distinguishes C_x from 5-methyl cytosine. The relative positions taken by C_x and cytosine, however, are independent of the pH of the solvent. Examination of hydrolysates by chromatographic methods has revealed the maximal cytosine content of T6r+ to be 0.2 p. 100 of the C_x content. Conversely, the maximal C_x content of *E. coli* DNA and thymus DNA were found to be 0.6 and 0.2 p. 100 respectively of the cytosine contents.

C_x contains an amino group which may be removed by nitrous acid. Deaminated C_x then exhibits chromatographic properties

bearing a relation to those of uracil comparable to the relation of the original C_x to cytosine. The ultraviolet absorption spectra of these compounds were examined, and the maxima at various pH's, presented in table II, distinguish C_x from a nucleoside, a 5-OH derivative, or a 4-methyl derivative.

TABLE II. — Ultraviolet absorption maxima.

	pH 4 <i>mμ</i>	pH 7-8 <i>mμ</i>	pH 13 <i>mμ</i>
C_x	278	269	284, 230
Cytosine	275	267	280, 223
5-methyl cytosine	283	274	287
4-methyl cytosine	276	268	277
Cytidine	280	271	272
Desoxycytidine	280	272	272
Deaminated C_x	261	261	285
Uracil	259	259	283
Thymine	264	264	288
5-OH uracil	278	298, 239	304
4-methyl uracil	261	261	276

A new nucleotide has now been isolated from virus hydrolysates which contains a base which appears to be C_x [8]. The nucleotide migrates similarly on paper as deoxycytidylic acid but may be separated from the latter and other contaminants of the fraction on ion exchange resins.

Thus the host, *E. coli* strain B, contains the pyrimidine, cytosine, which is absent from the T2, T4, or T6 viruses. Conversely, these viruses contain a new base, C_x , which is absent from the host and which seems to bear a structural similarity to cytosine. Weed and Cohen prepared pyrimidine-labeled *E. coli* by growth in the presence of labeled orotic acid [6], and infected the host in the absence of label in the medium. Virus nucleotides were isolated and the fraction containing the C_x nucleotide was heavily labeled. It appears possible that in virus synthesis host cytosine is converted to C_x . If the infected cell is no longer capable of synthesizing cytosine, it is conceivable that this alone would account for the inability of the host to continue synthesizing many host constituents. In this light, it becomes of interest to analyse a lysogenic system for the presence of C_x .

Studies are being continued on the structure and origin of C_x and its relation to other problems of virus synthesis. It is evident that if the existence of a unique virus constituent extends to animal virus systems as well, this may prove of great interest in the chemotherapy of virus infections.

BIBLIOGRAPHY

- [1] S. S. COHEN and R. ARBOGAST. *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 707.
- [2] S. S. COHEN and R. ARBOGAST. *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 619.
- [3] E. CHARGAFF. Personal communication.
- [4] A. MARSHAK. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1951, **37**, 299.
- [5] J. D. SMITH and G. R. WYATT. *Biochem. J.*, 1951, **49**, 144.
- [6] L. L. WEED and S. S. COHEN. *J. biol. Chem.*, 1951, **192**, 693.
- [7] G. R. WYATT. *Biochem. J.*, 1951, **48**, 584.
- [8] L. L. WEED. Personal communication.

ENZYMATIC ACTIVITY AND BACTERIOPHAGE INFECTION

III. — INCREASE OF DESOXYRIBONUCLEASE.

by ARTHUR B. PARDEE and IDAMAE WILLIAMS.

(From The Virus Laboratory, University of California,
Berkeley, California, U. S. A.)

As a continuation of work dealing with the influence of virus infection on the activities of enzymes in bacterial cells [1, 2] we have studied changes in activities of five enzymes during the course of virus infection. Three strains of the « T » series of coliphages — T2r, T2r+ and T3 — were used in order to make comparisons between different viruses.

It was found that infection by each of these three viruses halted bacterial multiplication, protein synthesis, ribonucleic acid synthesis, and production of four of the five enzymes studied. Infection stopped production of desoxyribonucleic acid in the case of T3, but production recommenced in about 10 minutes with T2r and T2r+. Furthermore, an increase in desoxyribonuclease of varying magnitude followed infection of bacteria by any one of the three viruses. A preliminary report of these observations has appeared [3].

METHODS.

E. coli (strain B) was grown with strong aeration in 1.5 l medium containing glycerol, Difco Casamino acids and salts, as previously described [4]. When the bacterial density reached approximately 4×10^8 cells per ml, a 150 ml sample was removed and poured onto 100 g of cracked ice in plastic centrifuge tubes. This sample was centrifuged in the cold to sediment the cells, which were then resuspended in 9.0 ml distilled water, treated for 5 minutes in a Raytheon 9 KC sonicator and diluted to 10.0 ml. More than 99 p. 100 of the cells were killed by this procedure. The preparation was used for chemical and enzymatic analyses without further treatment. A 5-fold multiplicity of virus was added to the remainder of the culture and aeration was continued. Further samples were taken at various times, usually at 5 minute intervals, and treated in the same way.

In the course of the experiment aliquots of the culture were also removed periodically for determinations of turbidity, total and viable bacterial counts, and plaque counts of virus.

Protein was determined by the biuret method, as previously described [4]. Nucleic acids were determined by the method of Schneider [4]. Also, total nucleic acid was determined by measuring optical density of the hot TCA extract at 260 m μ . It was found that washing with acid, alcohol and ether was unnecessary.

The activities of apyrase, formic dehydrogenase, and protease were determined as previously described [2]. Ribonuclease (RNAase) and desoxyribonuclease (DNAase) were assayed by determining absorption of light at 260 m μ by material soluble in acidic alcohol after incubation of extract and RNA or DNA, respectively. Optimal conditions were determined (table I, table II). The procedure for RNAase was as follows: 100 mg

TABLE I. — Optimal Conditions for RNAase.

The reaction mixture contained 0.1 ml 0.5M phosphate (pH 7.5), 0.1 ml 1.0 M NaCl, 0.1 ml 0.2% p. 100 RNA, and 0.2 ml of 0.6 p. 100 extract. Incubated 0 min. or 20 minutes (in duplicate) at 37°. One condition, listed below, was varied. Numbers are differences in optical densities of samples at 0 min. and 20 min., after precipitation and dilution. The sample run under standard conditions is underlined.

VARIABLE	ACTIVITY	VARIABLE	ACTIVITY
pH 6,0	0,07	0 p. 100 extract. .	0,00
6,5	09	0,3 — — . .	09
7,0	13	0,6 — — . .	16
7,5	16	0,9 — — . .	25
8,0	14	1,5 — — . .	38
8,5	06		
0,0 MNaCl . . .	13	Incubation 10 min.	0,06
0,02 — . . .	14	20 —	16
0,1 — . . .	16	30 —	22
0,2 — . . .	16	40 —	29
0,4 — . . .	19	60 —	43
0,00 p. 100 RNA.	0,00		
0,13 — — .	17		
0,25 — — .	16		
0,5 — — .	18		

of commercial RNA was dissolved in 1.1 ml of 0.2 M KOH. After centrifugation to remove insoluble material, 7.0 ml of glacial acetic acid was added to the supernatant. The precipitate was centrifuged, washed with 10 ml H₂O, then with 10 ml of 70 p. 100 ethanol. To the precipitate was added 3.0 ml 0.5 M Na₂HPO₄, 1.5 ml 2 M NaCl, the pH was adjusted to

TABLE II. — Optimal Conditions for DNAase.

Conditions were those described in the text except that one condition, listed below, was varied. Numbers are optical densities of samples.

VARIABLE	ACTIVITY	VARIABLE	ACTIVITY
pH 6,0 (PO ₄)	0,46	0 ml extract	0,06
6,5 —	0,55	0,1 — —	0,71
7,0 —	0,73	0,2 — —	1,08
7,5 —	0,83	0,4 — —	1,91
7,0 (tris)	0,74		
7,5 —	1,00	1,5 h incubation	0,38
8,0 —	1,08	3 — —	0,73
8,5 —	1,08	5 — —	1,08
9,0 —	1,12	7 — —	1,38
0,0 ml MgSO ₄	0,28		
0,05 — —	0,39		
0,10 — —	0,61		
0,20 — —	1,08		
0,40 — —	0,80		
0,0 ml DNA	0,12		
0,1 — —	0,81		
0,2 — —	1,08		
0,3 — —	1,12		
0,4 — —	1,37		

7.5 with KOH and the volume was made to 9.0 ml. To 0.3 ml of this solution was added 0.2 ml of bacterial extract containing about 0.1 mg protein. The reaction mixture was incubated for 1 hour at 37°, then 0.5 ml 0.17 M trisodium citrate (adjusted to pH 4.6) and 2.5 ml of 95 p. 100 ethanol were added. After several hours at room temperature, the precipitate was removed by centrifugation, and the optical density at 260 mμ of 1.0 ml of the supernatant plus 2.0 ml H₂O was measured in the Beckman spectrophotometer. Enzymatic activity was expressed in terms of the difference in optical densities between the sample and a blank which contained no RNA.

Desoxyribonuclease was determined as follows :

Tubes were prepared containing 0.2 ml 0.15 M MgSO₄, 0.2 ml 0.03 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol buffer (tris), pH 8.0, 0.2 ml H₂O, 0.2 ml 0.3 p. 100 highly polymerized DNA, and 0.2 ml of bacterial extract containing about 0.1 mg of protein. Blanks were prepared without DNA. Tubes were incubated 3 to 6 hours in various experiments. It was found that the optimal amount of reaction took place in about 5 hours at 37°. Then 0.5 ml 0.17 M trisodium citrate (pH 4.6), and 2.5 ml 95 p. 100 ethanol were added. The samples were left from 7 to 24 hours at room temperature, centrifuged and the optical density of the

supernatant was determined at 260 m μ . Enzymatic activity was expressed as the difference in optical densities between the sample and blank readings, divided by the hours of incubation.

RESULTS.

Figure 1 shows data from a representative experiment with bacteria infected with T2r. Protein and RNA did not appreciably increase; the concentration of DNA remained unchanged

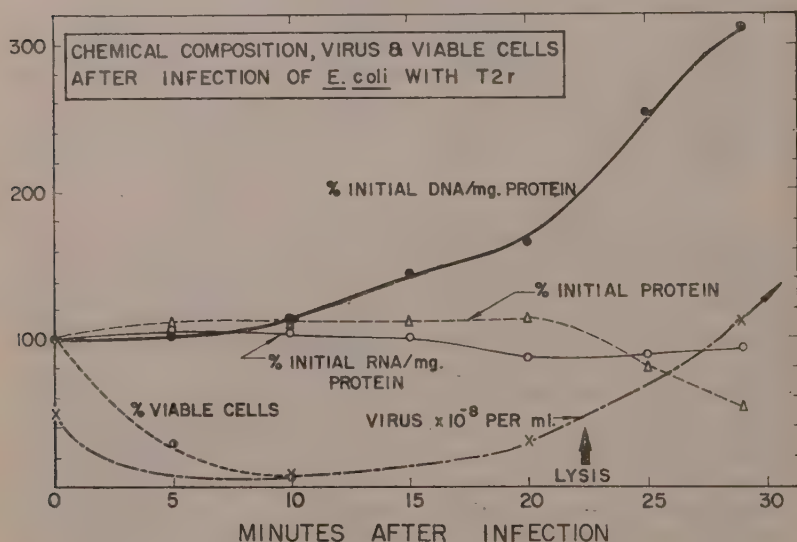


FIG. 1.

for about 10 minutes and then rose sharply, as observed by other workers [5]. This graph also shows the number of viable cells and the bacteriophage concentration in the culture. The rather slow decrease in the viable cell count observed in this experiment may be attributed to use of a medium more acid than usual. The final yield of bacteriophage from 4×10^8 cells per ml was 3×10^{10} particles per ml, although in other experiments up to 10^{11} particles per ml were obtained. The turbidity and total bacterial count remained substantially constant after infection.

Figure 2 shows, for the same experiment, specific enzyme activities of sonically broken cell preparations, as percentages of the corresponding activities of uninfected cells. The specific activities of protease, apyrase, ribonuclease, and formic dehydrogenase did

not change significantly in infected cells. Since the amount of protein was also constant, we conclude that these enzymes are not produced in infected cells. In contrast, the specific activity of DNAase increased approximately 70 p. 100 above the initial value in various experiments, between 5 and 15 minutes after infection and then remained constant until the time of lysis. The increase of total activity is more rapid than that observed

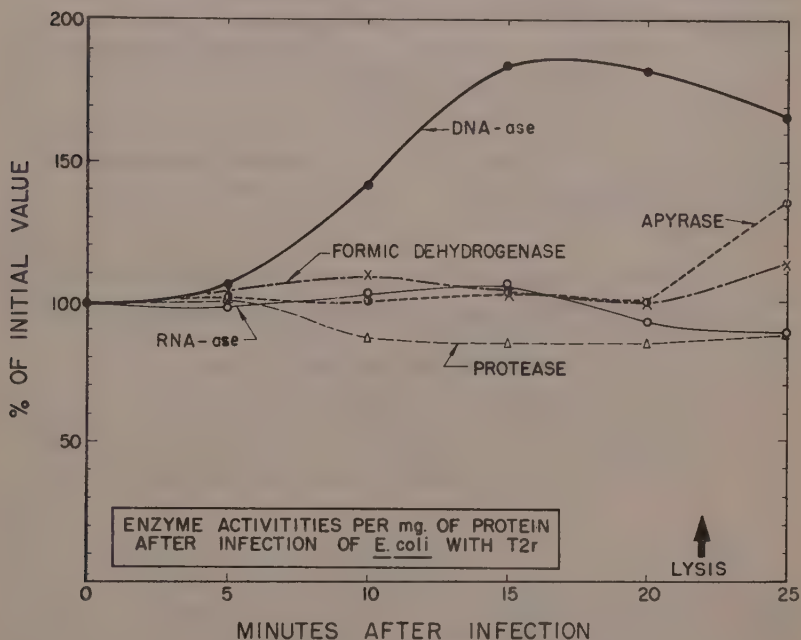


FIG. 2.

in growing, uninfected cells. Therefore, infection increases the activity of at least one enzyme.

Similar results have been obtained with cells infected with bacteriophage T2r⁺, except that the cells did not lyse until about 90 minutes after infection. The activity of DNAase increased 100 p. 100 on the average, slightly more than in the previous case, and DNA continued to increase.

Figures 3 and 4 show results obtained with cells infected with bacteriophage T3. In contrast to the findings in experiments with T2, there was no measurable increase in DNA following infection. The increase in DNAase was also much smaller, varying between 20 and 40 p. 100. Thus the smaller production

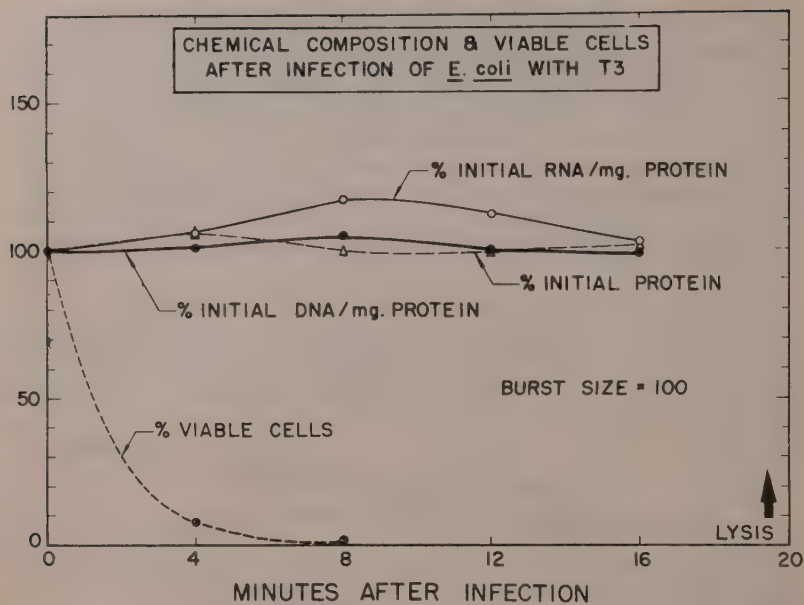


FIG. 3.

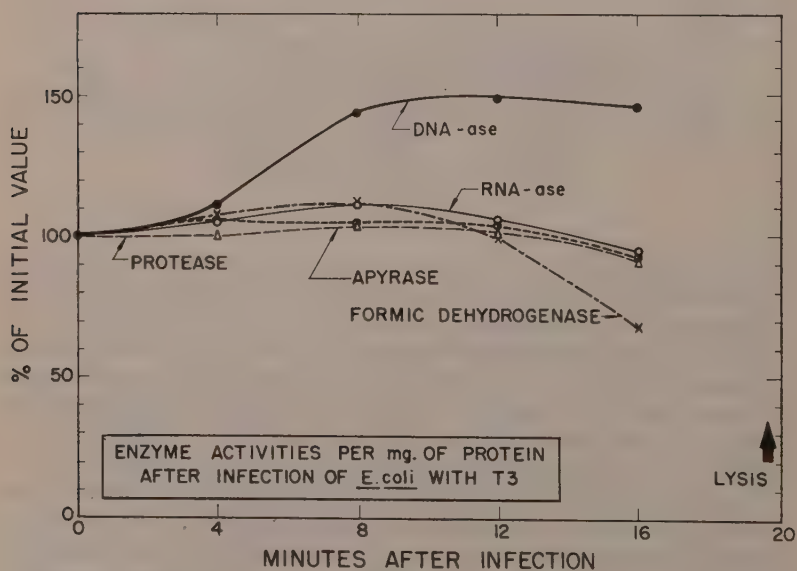


FIG. 4.

of new DNA was accompanied by a smaller appearance of DNAase. Other workers have found a smaller uptake of P^{32} from the medium in the case of small phages as compared to large [6, 7], indicating a smaller net synthesis of DNA.

In one instance, the quantities of protein, RNA and DNA released into the medium by cells infected with T2r+ were measured. Only a small percentage (less than 5 p. 100) of each constituent was found outside the cells during the first 30 minutes of infection. Thereafter, considerable amounts were released. At 1 hour, 17 p. 100 of the protein, 38 p. 100 of the RNA and 20 p. 100 of the DNA were found in the medium.

The observed increase in DNAase is not an artifact caused by sonic oscillation, as shown by the following experiment. Normal and T2r infected cells were broken by grinding with alumina. An increase of DNAase of 53 p. 100 was observed at 15 minutes after infection, as compared with a similar increase of 63 p. 100 with sonically broken cells.

The enzymes studied were relatively stable to treatment in the sonic oscillator except possibly formic dehydrogenase, as shown by the following experiment. Samples treated for 15 minutes gave the following activities (samples treated 5 minutes taken as 100): DNAase 95, RNAase 110, apyrase 90, formic dehydrogenase 60, protease 96. Earlier experiments [2] did not indicate lower enzyme activities in sonic extracts compared to those prepared by grinding with alumina.

DISCUSSION.

Two observations may be made on the basis of the above data. First, production of several enzymes ceases at once upon infection. Second, infection brings about an increase greater than that found in uninfected cells in the activity of DNAase.

The observed cessation of enzyme formation is like the observation, made by Cohen and Anderson [8], that after infection of coli with T2r+ the rate of oxygen uptake and CO_2 output of whole cells did not change. Joklik [9] has recently found that activities of a number of enzymes are unchanged in bacteria upon infection, whereas other enzymes decrease in activity. This means that enzymes are not formed more rapidly than they are destroyed. The cessation of net enzyme formation is related to the observations of Monod and Wollman [10], who showed that certain adaptive enzymes were not formed in infected *E. coli*. It has been concluded that enzymes are not formed in infected cells.

Since all enzymes that have been measured remain active, at least partially, after infection one might expect the formation of

more RNA, DNA and protein (including enzymes). However, syntheses are halted ; therefore some process must occur such as the diversion of energy or of small essential molecules (building blocks) from bacterial synthetic pathways to pathways of virus synthesis, or destruction of organized entities involved in formation of macromolecules. In connection with the first possibility, Jacob has shown that when glucose is supplied in limiting amounts it is preferentially utilized for virus production [41]. The observations of Luria and Human [42] and of Murray, *et al* [43] of rapid disruption of nuclear organization within cells upon infection supports the other possibility.

In the present work no increase of apyrase was observed, in contrast to earlier work [4]. We attribute this to a technical defect in the earlier work. In those experiments cells were disrupted by grinding with alumina, after which the cell debris was discarded. It is now known that the debris is relatively rich in apyrase [2], so that the presence of variable amounts of debris in the final extract, depending upon the progress of virus infection, might result in an apparent change in activity.

We may now consider the increase of DNAase activity. The quantity that is measured when one determines « DNAase » is the ability of the extract to perform a certain function, namely to increase the solubility of DNA in acidic alcohol. Such a change in activity might be caused by variation of a number of environmental factors, principally activators or inhibitors added or removed, or it might be caused by an actual change in the amount of an enzyme. Choice of conditions to provide an optimal rate of reaction eliminates effects of known activators, but the existence of others should be tested.

In speculating on the meaning of this change in activity, it may be mentioned that although one measures the ability of some enzyme or group of enzymes to solubilize (depolymerize) DNA, the true role *in vivo* of the enzymes might be the reverse, namely to polymerize smaller constituents into « native » DNA. This hypothesis is tempting because it is in harmony with the observed large rise in DNA following the appearance of new DNAase activity in T2r infected cells and the small increase in DNAase, not followed by a change in DNA, in cells infected with T3. It is also possible that the DNAase originally present in the cell is different from the DNAase appearing after infection (assuming more enzyme to be formed). The first enzyme could be involved in formation of bacterial DNA and the second in viral DNA. As yet there is no evidence for these speculations ; however, it may be noted that the rate of synthesis of DNA in intact cells and the rate of depolymerization of DNA *in vitro* are numerically very similar (about 1 mg DNA per minute per mg of protein).

Although DNAase was the only enzymic activity observed to increase markedly after infection, it is quite possible that other enzymes, as yet not measured, also increased. The quantity of new enzymes formed could not compare in mass to the amount used in normal bacterial synthesis, if it is assumed that the greater part of bacterial protein is of enzymic nature, because there is not a large increase in bacterial protein upon infection. In this connection, Cohen has reported an increase in protein (apparently about 30 p. 100) after infection [5] which we have not observed. The exact explanation for this difference in results is not clear. Differences in media and especially in methods of « protein » assay could be responsible.

In conclusion, a tentative hypothesis for the primary steps in the attack of virus on bacterial cells will be outlined. It may be supposed that the tightly packed viral DNA enters a cell [14] and expands through a considerable part of the cell. The DNA combines with cellular proteins of various types, displacing bacterial DNA, disrupting cellular organization, and halting formation of macromolecules (DNA, RNA, enzymes) which require a complex cell organization. In particular, the viral DNA acts as an inducer for adaptive enzyme formation and brings about formation of new enzymes, such as DNAase. In a very limited sense it may be said that, assuming proper organization, the new enzymes could lead to the formation of a new product — virus — rather than to bacterial multiplication.

SUMMARY.

1° Quantitative measurements have been made of the following entities in *E. coli*, strain B at various times during infection: protein, ribonucleic acid, desoxyribonucleic acid, viable and total cells, virus, turbidity, apyrase, protease, formic dehydrogenase, ribonuclease, and desoxyribonuclease. Optimal conditions for the last two enzymic activities were determined.

2° After infection with viruses T2r, T2r+, or T3, protein, ribonucleic acid, and the enzymes, except desoxyribonuclease, remained constant, indicating that virus interferes with synthesis of enzymes and macromolecules.

3° After infection, desoxyribonuclease activity increased within ten or fifteen minutes by approximately 70, 100 and 30 p. 100 for the three viruses, respectively.

4° Approximately ten minutes after infection with T2r or T2r+ the desoxyribonucleic acid content of the cells rose rapidly. After infection with T3 a similar change was not observed.

5° These findings are discussed in connection with the process of viral infection.

BIBLIOGRAPHY

- [1] A. B. PARDEE. *J. gen. Physiol.*, 1951, **34**, 619.
- [2] A. B. PARDEE and R. E. KUNKEE. *J. biol. Chem.*, 1952, **199**, 9.
- [3] A. B. PARDEE and I. WILLIAMS. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **40**, 222.
- [4] W. C. SCHNEIDER. *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 293.
- [5] S. S. COHEN and R. ARBOGAST. *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 619.
- [6] L. W. LABAW. *J. Bact.*, 1951, **62**, 169.
- [7] E. A. EVANS JR., F. W. PUTNAM and L. PALM. *Fed. Proc.*, 1952, **11**, 209.
- [8] S. S. COHEN and T. F. ANDERSON. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 511.
- [9] W. K. JOKLIK. *Brit. J. exp. Path.*, 1952, **33**, 368.
- [10] J. MONOD and E. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 937.
- [11] F. JACOB. *Ces Annales*, 1952, **82**, 1.
- [12] S. E. LURIA and M. L. HUMAN. *J. Bact.*, 1950, **59**, 551.
- [13] R. G. E. MURRAY, D. A. GILLEN and F. C. HEAGY. *J. Bact.*, 1950, **59**, 603.
- [14] A. D. HERSHEY and M. CHASE. *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 39.

GENETICAL STUDIES ON BACTERIOPHAGE T1

by CARSTEN BRESCH.

(*Max Planck Institut für physikalische Chemie, Göttingen*
[Direktor : Prof. K. F. BONHOEFFER].)

After the discovery of genetical exchange in bacteriophages by Delbrück and Bailey [1], this phenomenon has mainly been investigated on serologically and morphologically related phages of the T-even group, particularly on T2 by Hershey and Rotman [2, 3]. Recently Visconti and Delbrück [4], interpreting quantitative results by mathematical treatment of the population genetics involved, postulated a process (mating) very similar to the well-known crossing-over phenomenon in higher organisms, which may result in recombination of genetical factors originally located in different parental phages.

The bacteriophage T1 is not related to the T-even group, i. e., although acting upon the same host, it is morphologically and serologically different. Furthermore it shows several remarkable differences [5], e. g. the absence of any multiplicity reactivation after UV-irradiation. Thus it seemed interesting to compare the genetical behaviour of T1 with that of T-even group.

MATERIAL AND TECHNIQUE.

The bacteria employed were *Escherichia coli*, strain B, and a mutant strain B/1 selected from B by T1 [cf. 5]. All strains of phages originated from single plaques and were prepared in bubbled bacterial cultures and stored at 4° C after filtration through a membrane.

The usual way of making a cross consisted in adding 1 ml of a bacterial culture growing in broth and containing about 10^8 cells, to a 0.5 ml mixture in broth of the parental phages containing about $6 \cdot 10^8$ particles of each type. After 8 minutes at 37° C about 30-50 p. 100 of the phages were adsorbed giving a multiplicity of infection of 2-3 phages of each type. Then after a suitable dilution, the single burst technique [5] was employed.

The only difference from the usual procedure was the use of the bacterial surface layer and the addition of two dye-stuffs (water blue and metachrome yellow) to the common agar plate.

This double staining method allowed a distinct differentiation of several mutants of phage T1. An exact description of preparation of these plates will be given in the appendix.

RESULTS.

1° MUTATIONAL PATTERN. — On these plates the plaque of wild type T1 was a little smaller than on normal agar and showed a broad blue halo in excellent contrast to the blue-greyish bacterial layer. Among such plaques now and then some mutant plaques were observed from which new phage strains could be picked up. By this way we succeeded in isolating a strain *T1c* forming tiny plaques with only a very small blueish margin and

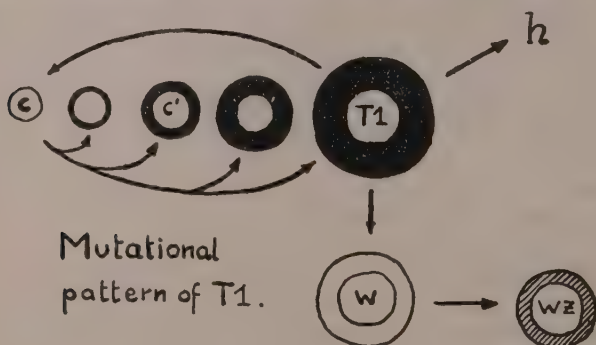


FIG. 1.

without any halo, and a strain *T1w* with plaques a little smaller than those of the wild type but with a broad yellow halo. Furthermore among the yellow plaques of *T1w* we repeatedly observed another type which we called *T1wz*. The plaques of *T1wz* were of a pale violet grey and the halo was a little smaller than that of *T1w*.

The type *T1c* could mutate backwards. This could be seen by little blue « caps » which the plaques of *T1c* often showed. That is to say that in a certain sector the plaque had a small blue halo round it. By picking it up it was possible to obtain several new strains of which the plaque characters were all intermediates between *T1c* and the wild type. Except for one strain called *T1c'* which formed small plaques with very slender blue halos, these different mutants have not yet been investigated in detail. Moreover we isolated the well known host range mutant *T1h*.

In summary we could establish the mutation pattern given in figure 1.

2° QUALITATIVE CROSSES WITH TWO FACTORS. — With these mutant strains several crosses were possible.

a) The cross ($w+z+ : wz$)

gave, as expected, two recombinants : $wz+$ and a new type $w+z$, which showed plaques a little smaller than those of the wild type. Moreover the halo was a little more slender and stained blue more deeply. From such plaques the strain $w+z$ was isolated and crossed back with the strain $wz+$ giving rise to the expected recombinants $w+z+$ and wz . However the differentiation of T1z from T1 was not completely satisfactory on all plates.

b) The cross ($cw+ : c+w$)

gave rise to the wild type $c+w+$ and the new strain cw , the identification of which was rather difficult because of the absence of any halo. It formed plaques very similar to those of T1c differing only occasionally by a more or less intensive blue staining of the margin. On most plates these were not distinguishable by plaque morphology. Thus, picking up and crossing back with the wild type was necessary to test the character of any one plaque. Then either in the case of $cw+$, no recombinants were obtained ; or in the case of cw , the recombinants T1w and T1c, the latter being identified better in this cross than the cw in the corresponding one ($cw+ : c+w$).

The preparing of a pure cw stock was rather difficult because in most cases it was overgrown by other mutants. One of these mutants was T1w. Another mutant which formed a very slender yellowish halo was the yellow analogue of $c'w+$. This will be shown below. It was therefore called $c'w$.

c) The cross ($c'w : c+w+$)

produced only two kinds of recombinants, namely $c'w+$ and $c+w$ which indicated that the gene c' represented a third allele of the c gene or at least that there existed a strong linkage between the c gene and the one responsible for the larger plaque type. The type $c'w+$ is identical with the above mentioned mutant strain $c'w+$, arising in preparations of the stock $cw+$, as could be proved by crossing both strains with each other or with other strains, e. g. with the strain $c+w$. The absence of possible recombinants in the first cross and the appearance of the same recombinant types in the second cross showed that both $c'w$ types are genetically identical. These facts justified the above given nomenclature.

Further crosses involving the host range gene h resulted as expected :

d) The cross ($c+h : c'h+$)

gave rise to $c+h+$ and $c'h$.

e) The cross ($w+h : wh+$)

gave rise to $w+h+$ and wh .

The characters of the 2 new types from these crosses could be corroborated by crossing them back.

It should be mentioned that in a burst sometimes one or even several plaques were found showing features either quite strange or similar to the expected types. These plaques were regarded

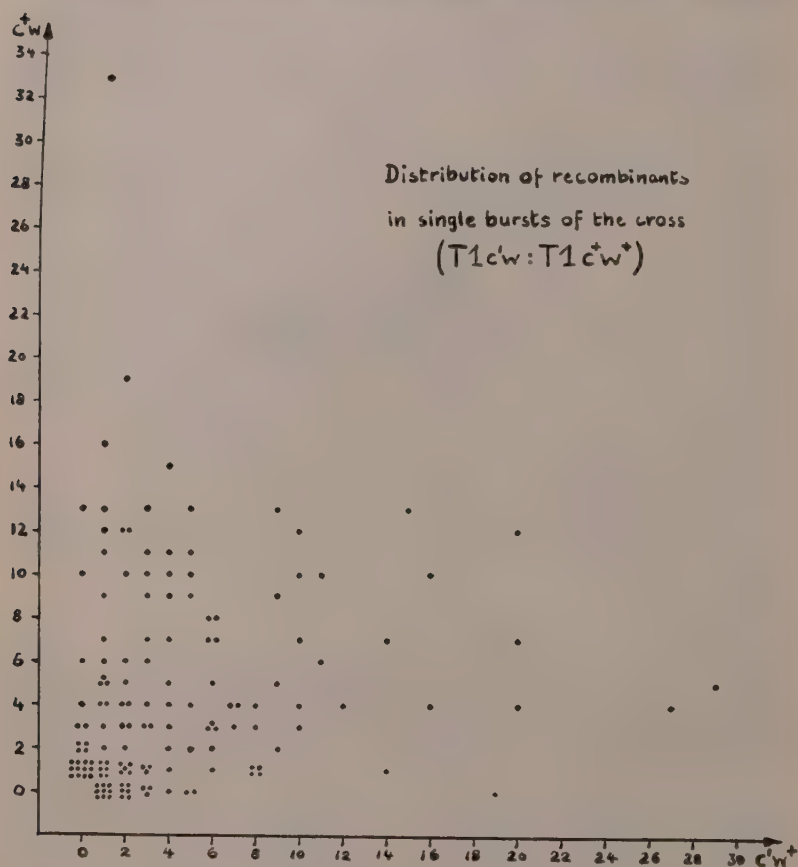


FIG. 2.

as caused by newly arisen mutations, or by the influence of genes which appear phenotypically after recombination into another genetical surrounding.

3° QUANTITATIVE CROSS. DISTRIBUTION OF RECOMBINANTS IN SINGLE BURSTS. — Among others, the cross ($c'w : c^+w^+$) permitted differentiation of both recombinants with absolute confidence.

Thus it was employed to determine the exact numbers of the recombinants $c'w^+$ and c^+w in a series of 300 single bursts (mixed bursts without any recombinants have not been tabulated). From the number of plates without any burst, it was calculated by Poisson-distribution, that about 5 p. 100 of all examined plates, i. e. about 17 p. 100 of the bursts tabulated in figure 2 would contain two or more bursts. The results were analogous to the previous findings of Hershey and Rotman [3] with T2 showing that also in the case of T1, little or no correlation between the numbers of opposite recombinants was found. Furthermore by adding together all the numbers of recombinants in the examined bursts a relation 691 c^+w : 662 $c'w^+$ was obtained, giving evidence of the 50 : 50 relationship reported by Hershey and Rotman [3].

4° CROSSES INVOLVING THREE FACTORS. — Both kinds of 3-factor crosses performed so far gave rise to the expected 6 types of recombinants, the frequencies of which are tabulated below :

a) [c^+w+h : $c'wh^+$] :

c^+w+h (exchange of c')	c^+wh^+	c^+wh (exchange of w)	c^+w+h^+	c^+w+h (exchange of h)	c^+wh
227	209	31	34	170	135

b) [$c'w+h$: c^+wh^+] :

c^+w+h (exchange of c')	$c'wh^+$	$c'wh$ (exchange of w)	c^+w+h^+	$c'w+h$ (exchange of h)	c^+wh
247	289	35	52	211	191

The results of both crosses were obviously in agreement. Probabilities for the exchanges of the 3 genes involved could be calculated by adding the correspondent pairs of numbers of both experiments and defining the exchange of c' as 1,0 :

c'	w	h
1.00	0.16	0.73

These values elucidated a linkage between all the three genes involved. Without any linkage they ought to have been equal, while in the case of a linkage between two genes (the third unlinked) the exchange of the unlinked ought to have been of the greatest frequency and the two smaller values left are expected to be equal.

Therefore in bacteriophage T1 a linkage group

$c' \text{ ----- } w \text{ ----- } h$

must be assumed.

5° CROSS WITH THREE PARENTAL TYPES. — For this purpose, 3 parental phage stocks are needed, each of them carrying one of the 3 employed genes in one allelic form, while both the other phage stocks show this gene in the other allelic form. Such a cross gives five possible recombinant types. Four of these can arise each by recombination between only two of the parental types, while the fifth will appear only in case of recombination between all three parental phages.

The cross performed was ($c'wh^+$: $c+w+h^+$: $c+wh$) which gave rise only to recombinants already known (each phenotypically distinguishable from the others). A lot of single burst plates were examined showing in summary about 900 recombinant plaques, among which 6 plaques of the type $c'w+h$ were found. This was the fifth type, which could only originate by recombination between all 3 parents, for it contained one marker derived from each parent type (small plaque size from the first, blue staining colour from the second, and the ability to lyse B/1 from the third).

For confirmation, the genetic composition of 3 of the 6 $c'w+h$ plaques were investigated by crossing them back with the strain $c+wh^+$, which led to the expected recombinants.

In terms of the mating theory of Delbrück and Visconti this 3-parental cross was proof of the fact that at least some particles of the offspring mated more than once. Nevertheless an exact determination of the number of rounds of mating has not been possible yet, because three unlinked genes should be available for this purpose.

SUMMARY.

By application of double stained nutrient agar several plaque type mutants of bacteriophage T1 could be isolated making genetical work with T1 possible.

In a 2 factor cross no correlation of the numbers of opposite recombinants was found in single bursts, though in summary they show a 50 : 50 relation.

Crosses with 3 factors revealed a linkage between all 3 genes involved, as could be seen from the unequal numbers of the 3 corresponding pairs of recombinants.

A cross with 3 suitable parental phages gave rise to recombinants with markers derived from 3 different parents.

All results obtained with T1 were in full agreement with the previous findings of Hershey and Rotman [2, 3] on T2, and with the phage mating theory recently developed by Visconti and Delbrück [4].

I am indebted to Fräulein Ursula Graack for indefatigable and conscientious assistance.

APPENDIX.

Methods of plate preparation.

1 liter of distilled water and 30 g of powdered nutrient agar (Firma Bram, Berlin-Lichterfelde) are boiled in the steamer. After 60 minutes 15 g of glucose are added and boiled for another 30 minutes. Before pouring the plates 5 ml of a 2 p. 100 solution of Waterblue (Merck) and 25 ml of a 2.5 p. 100 solution of metachrome yellow (Merck) are added. Both dye-stuffs have to be boiled for a short time and may be prepared in larger quantities, but must be stored at 4° C. Plates are dried openly and upside down on filter paper at 37° C.

The quantities given can be altered for special purposes. This staining technique is rather dependent on the dye-stuffs and nutrient agar employed. Both should be chosen carefully.

REFERENCES

- [1] M. DELBRÜCK and W. T. BAILEY Jr. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.*, 1946, **11**, 33-47.
- [2] A. D. HERSHEY and R. ROTMAN. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1948, **34**, 89-96.
- [3] A. D. HERSHEY and R. ROTMAN. *Genetics*, 1949, **34**, 44-71.
- [4] N. VISCONTI and M. DELBRÜCK. *Genetics*, 1952, *in the press*.
- [5] S. BENZER, M. DELBRÜCK et al. In *Virus*, 1950, publ. by California Institute of Technology.

THE GENOTYPICALLY AND PHENOTYPICALLY HEAT RESISTANT FORMS IN THE T5 SPECIES OF BACTERIOPHAGE (1).

by MARK H. ADAMS.

*(Department of Microbiology,
New York University College of Medicine,
New York City. N. Y.)*

In a previous publication (Adams, 1949) the marked instability of phage T5 when suspended in dilute salt solutions was contrasted with the relatively great stability of this virus in broth or in more concentrated salt solutions. Later this lack of stability in dilute salt solutions was shown to be a common property of the strains included in the T5 species of bacteriophage (Adams, 1952). The properties of a heat resistant mutant of phage T5 have been reported (Adams and Lark). The mutant, designated T5st, is at least 10^4 fold more stable in low salt concentrations than is the ancestral type, T5st+. The presence of phenotypically heat resistant but genotypically heat susceptible phage particles in single plaque stocks of the heat susceptible T5st+ phage was also reported. These phenotypically resistant particles were present to the extent of about 0.1 p. 100 in all wild type T5st+ stocks tested providing the stock contained less than this frequency of resistant mutants. The phenotypically heat resistant phage particles were similar in stability to the heat resistant mutants so that the two forms could not be distinguished by differential heat inactivation. On subculture the phenotypically resistant particles gave rise to stocks indistinguishable from the heat susceptible wild type T5st+ phage, while the mutant particles gave rise to pure stocks of the heat resistant mutant T5st.

It was felt worthwhile to see if an estimate could be obtained of the rate of mutation to heat resistance. Also the frequency of occurrence of the phenotypically heat resistant forms in the various strains included in the T5 species has been investigated.

(1) Aided by a grant from the National Foundation for Infantile Paralysis, Inc.

MATERIALS AND METHODS.

The properties of wild type phage, T5st+, and of its heat resistant mutant T5st were reported in a previous publication (Adams and Lark). As was shown in previous papers (Adams, 1951), the heat resistant forms of phage T5 may be readily assayed for in mixtures with the heat susceptible form by heating the mixture at 50 C in a diluent containing 0.4 N NaCl, 0.01 N sodium citrate buffer at pH 6.8, and 100 micrograms per ml of gelatin. Under these conditions the heat susceptible particles are inactivated in the course of a few hours while the heat resistant mutant and the phenotypically resistant particles survive at least 8 hours with no detectable loss. Also it was shown that such an analysis of virus particles extracted from single isolated phage plaques enabled one to determine unequivocally whether the plaque was produced by a genotypically susceptible or genotypically resistant phage particle.

The host bacteria and the virus strains used have been described previously (Adams, 1952). The techniques used in phage work have been described in detail (Adams, 1950).

EXPERIMENTAL.

FREQUENCY OF HEAT RESISTANT MUTANTS IN WILD TYPE STOCKS OF PHAGE T5. — When heat susceptible wild type stocks of phage T5 are heated in the 0.4 N NaCl diluent for several hours all heat susceptible phage particles are inactivated while the heat resistant survivors remain active for many hours. These survivors amounting to between 1/1 000 and 1/2 000 of the original population are the phenotypically resistant particles which are unable to transmit this characteristic to their offspring. Any heat resistant mutants which were present in the original population would then be enriched at least 1 000 fold in the population surviving heat treatment. On subculture of this surviving heat resistant population, the phenotypically heat resistant particles would give rise to heat susceptible particles while the genotypically resistant mutant particles would give rise to heat resistant off-spring. Then heating of this subcultured population in the diluent should result in a further concentration of any heat resistant mutants present. Repetition of these procedures should result in the eventual production of a pure stock of the heat resistant mutant if the mutation rate is high enough, and the inoculum large enough to insure transfer of some mutant particles to the subculture.

A single plaque of T5st+ phage was used to inoculate 10 ml

of a culture of strain B containing 10^7 bacteria/ml. The culture was incubated with aeration to lysis giving a stock with a final titer of 1.5×10^{11} T5 particles/ml. A 2nd sample of this stock was diluted to 30 ml in the NaCl diluent and heated at 50 C, samples being taken for assay at intervals with the results shown in table I. The phage count decreased rapidly at first but

TABLE I. — The inactivation of a stock of the heat susceptible form of phage T5 in the 0.4 N NaCl, sodium citrate diluent at 50° C. The assays are of 10^{-5} dilutions of samples taken at intervals noted.

TIME OF HEATING	SURVIVING PHAGE per 0.1 ml of 10^{-4} dilution
0 min.	100 000
20 min.	4 200
30 min.	1 600
45 min.	800
1 hour	320
2 hours.	55,61
3 hours.	51
4 hours.	48
5 hours.	41
6 hours.	47

remained essentially constant from the 2nd through the sixth hour of heating. The final count of survivors was 4.7×10^6 /ml from an initial population of 10^{10} /ml or a proportion of $0.47/10^3$ of heat resistant particles in the original population. From the 2 hour assay plate containing 61 plaques, 20 were picked and tested to see whether they were produced by wild type or mutant phage particles. All 20 plaques were found to be typical of the heat susceptible T5st⁺ variety, so that the proportion of mutants in the heat resistant surviving population is probably less than 10 p. 100 and hence less than $0.5/10^4$ of the original population.

A 1 ml sample containing 4.7×10^6 surviving heat resistant phage particles from the first heat treatment was used to inoculate 10 ml of culture containing 10^7 B/ml. After lysis and filtration through a Mandler filter the resultant stock assayed 8×10^{10} particles/ml. This was diluted 1/80 in the diluent and heated for 7 hours at 50 C. The final titer was 8.1×10^5 survivors/ml from an initial count of 10^9 /ml or a survival of $0.8/10^3$ in the second heated stock.

Again 10 ml of a culture of B was inoculated with 1 ml of the second heated phage stock (8×10^5 particles) and incubated to lysis. After filtration this third stock assayed 7.3×10^{10} /ml. After 1/100 dilution to 7.3×10^8 /ml in the diluent and heating

at 50 C for 3 1/2 hours the diluted phage stock assayed 4.1×10^8 /ml, a survival of 56 p. 100. Single plaques picked from assay plates of the survivors were all typical of the heat resistant mutant. Therefore two cycles of culturing and heating have resulted in the isolation of the heat resistant mutant from a single plaque stock of the wild type T5st+ phage.

From these data one can calculate the frequency of the mutant phage particles in the original culture, if one assumes no selective advantage between mutant and wild type during multiplication. The calculations are as follows:

Third culture, after heating .	4.1×10^8 /ml
before heating.	7.3×10^8 /ml or 56% resistant mutants.
Second culture, after heating .	8×10^5 /ml total.
of which . . .	4×10^5 /ml are phenotypically resistant.
	4×10^5 /ml are resistant mutants.
before heating .	10^{10} /ml heat sensitive.
	4×10^5 /ml phenotypically resistant.
	4×10^5 /ml resistant mutants or 1 per 2,500 of the population.
First culture, after heating .	5×10^6 /ml total.
of which . . .	5×10^6 /ml are phenotypically resistant.
	2×10^3 /ml are resistant mutants.
before heating.	10^{10} /ml heat sensitive.
	5×10^6 /ml phenotypically resistant.
	2×10^3 /ml resistant mutants or two per 10^7 of the population.

Therefore the incidence of resistant mutants in the original culture would be two per 10^7 phage particles, assuming no selection during multiplication. If the incidence of mutants is $2/10^7$, the mutation rate may be less than 10^{-7} per phage duplication but probably not less than 10^{-8} .

A comparison of the properties of wild type and mutant stocks of phage T5 (Adams and Lark) failed to reveal anything which might confer an obvious selective advantage of one form in competition with the other. The two forms had the same adsorption rates on strain B, the same latent periods, the same burst sizes, and were equally stable in broth. Nevertheless the possibility of selection was tested for by direct experiment using a mixture of T5st and T5st+ particles in a known ratio as inoculum for a culture of B and determining the ratio of the two forms found in the resultant lysate.

The inoculum was prepared by adding enough T5st phage stock to a T5st+ stock to give a mixture of about 90 p. 100 wild type and 10 p. 100 mutant particles. A bottle of broth was inoculated with B and grown to a concentration of 10^7 /ml. This was distributed in 10 ml amounts into 5 aeration tubes. The tubes were then inoculated with various amounts of the synthetic

mixture of T5st+ and T5st phage particles and incubated with aeration until lysis appeared to be complete. Each resultant phage stock was assayed for total phage, and by appropriate dilution and heating at 50 C in the diluent, assayed for heat resistant phage. The results of this experiment are given in table II. It may be noted that the factor of increase of the phage

TABLE II. — A broth culture of strain B containing 10^7 cells/ml was inoculated with enough of the mixed T5st+ and T5st phages to give the final concentrations shown in the first column. After lysis, the resultant stocks were assayed for total phage and for heat resistant phage. The corresponding assays for the phage mixture used for inoculum are given also.

INITIAL PHAGE concentration	ASSAYS IN LYSATES		PROPORTION of heat resistant phage
	Total phage	Heat resistant phage	
$8 \times 10^7/\text{ml}$	$5,0 \times 10^9/\text{ml}$	$5,5 \times 10^8/\text{ml}$	0,11
8×10^7	$4,8 \times 10^9$	$6,9 \times 10^8$	0,14
8×10^6	$4,5 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$	0,12
8×10^5	$1,4 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^9$	0,10
8×10^4	$3,5 \times 10^{10}$	$3,9 \times 10^9$	0,11
Inoculum mixture . .	$8,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	0,15

inoculum varied in this experiment from 60 fold in the first two tubes to 4×10^5 fold in the last tube. In spite of this enormous variation in the amount of phage multiplication there is relatively little difference in the proportion of the heat resistant form in the various cultures. In all lysates the proportion of heat resistant mutants is somewhat less than the proportion in the phage inoculum indicating a possible slight selection in favor of wild type phage. However such a weak selection pressure would have no significant effect on the estimate of mutation rate made above.

FREQUENCY OF PHENOTYPICALLY RESISTANT FORMS IN DIFFERENT STRAINS OF THE T5 SPECIES OF BACTERIOPHAGE. — Phage strains PB, BG3 and 29 alpha are serologically related to phage T5 and have the same morphology as determined by electron microscopy. These four virus strains possess a nutritional requirement for calcium ion and have other physiological properties in common. Under conditions of mixed infection genetic recombination occurs indicating genetic compatibility among the strains in this serological group. The strains are readily differentiated on the basis of host range and of quantitative differences in certain physiological properties, among which may be mentioned resistance to heat inactivation in dilute salt solutions (Adams 1952). It was of interest to see if the property of phenotypic heat resistance is

common to the members of the group or is restricted to certain strains.

The diluent used for these heat inactivation studies contained 0.1 N NaCl, 0.001N trisodium citrate and 10 micrograms of gelatin per ml at a pH of 7.0. The chemicals were reagent grade dissolved in distilled water. The phages were diluted in cold diluent, and finally into diluent at a suitable temperature for the kinetic studies and sampled at intervals to determine the titer of surviving phage.

The results were qualitatively the same as those with the wild type T5st⁺ strain described above. The titer decreased rapidly with first order kinetics eventually leveling out at a survival of about 10⁻³. In some cases the heat resistant survivors were also inactivated in accordance with first order kinetics at a measurable rate at the temperature chosen for study. When this occurred the second slope of the inactivation curve was extrapolated back to the zero time ordinate to determine the concentration of heat resistant particles initially present. The results of these experiments are summarized in table III. In this table K1

TABLE III. — The occurrence of phenotypically heat resistant phage particles in various strains of the T5 species. The phages were heated in 0.1 N NaCl-0.001 N sodium citrate diluent at the temperatures indicated and the first order velocity constants for inactivation determined.

PHAGE STRAIN	HOST strain	TEMPERATURE C	INACTIVATION velocity constants		PROPORTION heat resistant
			K1 min ⁻¹	K2 min ⁻¹	
T5st ⁺	B	40	5,0	0,01 (50 C)	0,5 × 10 ⁻³
BG3	Alpha.	50	0,6	0,014	1,1 × 10 ⁻³
PB	Cullen.	50	1,0	0,007	0,9 × 10 ⁻³
29-alpha	Alpha.	57	0,4	0,008	1,4 × 10 ⁻³
T5st	B	65	0,35	None.	< 10 ⁻³
T5st	B	48	0,004		

refers to the first order velocity constant for inactivation of the major portion of the phage stock while K2 refers to the first order inactivation velocity constant of the heat resistant survivors. One is immediately struck by the fact that stocks of all the phage strains but one contained a proportion of about 10⁻³ of heat resistant particles. The only exception is the heat stable mutant, T5st, which showed no evidence for the existence of a phenotypically heat resistant kind of phage particle under the conditions of this experiment. In the other stocks, subculture of the

heat resistant survivors produced new stocks indistinguishable from the original stocks before heating, indicating in all cases that the heat resistant survivors were in reality phenotypically heat resistant and not heat stable mutants.

Another interesting observation concerns the actual stability of the phenotypically heat resistant survivors. As may be seen from the data in table III, the rates of inactivation of the phenotypically resistant forms of *T5st+*, BG3 and PB at 50 C are nearly the same as the rate of inactivation of the heat resistant mutant, *T5st*, at this temperature. The phenotypically resistant particles of 29 alpha are somewhat more heat resistant than the others. It seems almost as though the phenotypically resistant forms mimic the properties of the heat resistant mutant.

Another similarity between the phenotypically heat resistant forms and the heat resistant mutant is in the Arrhenius constant for heat inactivation. This constant for the mutant, *T5st*, has been precisely determined in the 0.001 N trisodium citrate, 0.1 N sodium chloride diluent over the temperature range from 50 to 65 C and is 65 000 calories. The Arrhenius constants for both the heat susceptible *T5st+* stocks and for the phenotypically resistant survivors of *T5st+* stocks in this same diluent have nearly the same value. The only chemical reaction with this large an Arrhenius constant is protein denaturation and it seems not unreasonable to assume that the inactivation of the various forms of phage T5 involves the same basic mechanism, heat denaturation of a protein.

When the phenotypically resistant form of *T5st+* is studied over a larger extent of inactivation, it is found to be heterogeneous with respect to stability to heat. About 20 p. 100 of the population is inactivated at one fifth the rate of the major portion. A similar heterogeneity has been observed in the heat susceptibility of the heat stable mutant *T5st*. In neither case is the heterogeneity genetic in origin since additional genotypes have not been found. These heat resistant populations are being further studied in the hope that some light will be shed on the mechanism of resistance.

THE ORIGIN OF THE PHENOTYPICALLY HEAT RESISTANT FORMS IN STOCKS OF *T5st+* PHAGE. — One can visualize several possibilities as to the type of stimulus which might result in production of phenotypically heat resistant phage particles.

1° They might result from mixed infection of a common host cell with both *T5st+* and *T5st* particles, in analogy with the production of phenotypic host range variants in bacteria mixedly infected with T2 and T4 as studied by Novick and Szilard.

2° They might occur sporadically as a biochemical accident

with a constant probability of occurrence, in which case they would occur in a series of cultures in a Poisson distribution.

3° They might be produced only in certain bacteria in the population as a result of some biochemical peculiarity of the host cell protoplasm, in which case they would be distributed in groups, all the phage particles multiplying in a restricted geographical region of a particular host cell being affected in such a way as to become heat resistant.

The first possibility is rendered unlikely by the fact noted above that single plaque stocks of T5st+ phage contain a proportion of about 10^{-3} phenotypic resistant particles but only 10^{-7} resistant mutants. Also the incidence of phenotypic resistant particles is not increased when the proportion of genotypically resistant particles in a mixed inoculum is greatly increased.

The other two possibilities were investigated in experiments analogous to the single cell burst technique, in which lysates from small numbers of infected bacteria were examined for the distribution of phenotypically resistant particles. In one such experiment fifty samples each containing an average of 3 infected bacteria were distributed into small tubes and incubated to lysis. To each tube was added 0.5 ml of 0.4 N NaCl, 0.01 N sodium citrate diluent, and the tubes were heated one hour at 50 C. After heating, 3 ml of 0.7 p. 100 melted agar inoculated with bacteria was added to each tube and the entire sample plated for surviving heat resistant phage particles. An additional set of 10 samples was assayed without heating to determine the average phage yield per sample. The distribution of surviving phage particles in the fifty samples is shown in Table IV together with a Poisson distribution

TABLE IV. — The distribution of phenotypically heat resistant phage particles among the lysates of fifty samples containing about three infected bacteria each. The last column is a Poisson distribution calculated on the proportion of blank samples.

PLAQUES PER SAMPLE	NUMBER of samples	PROPORTION OF SAMPLES	
		Observed	Calculated (Poisson)
0	20	0,40	0,40
1	12	0,24	0,367
2	6	0,12	0,168
3	4	0,08	0,051
4	3	0,06	0,012
5	2	0,04	0,002
6	2	0,04	
11	1	0,02	

bution based on the proportion of blank samples. It is quite apparent from Table IV that the distribution of phenotypically resistant phage particles is not Poisson, there being an improbably large excess of samples containing more than three surviving phage particles. The ten samples assayed for total phage contained 12,000 particles corresponding to 60,000 in the 50 samples. One of the ten samples contained no phage particles. This is reasonable since with a mean of 3 infected bacteria per sample 5 p. 100 of the samples should contain no infected bacteria. There was a total of 81 surviving heat resistant phage particles out of an initial population of 60,000 or an incidence of 1.35×10^{-3} . The average burst size based on the ten samples assayed was $12000/30$ or 400 per infected bacterium.

In this experiment all 81 plaques produced by the surviving heat resistant phage particles were subcultured and tested for heat resistance. All 81 subcultures were typical of the wild type heat susceptible T5st+ phage, proving that the heat resistant survivors were indeed phenotypically but not genotypically resistant.

Since the distribution of the heat resistant particles among the 50 samples was not Poisson, the production of each resistant particle is not an isolated and independent event. Instead, the distribution of the particles is definitely in groups or clones. The majority of the bursting bacteria liberate no heat resistant particles. Of those bacteria which do liberate heat resistant particles, the yield may vary from 1 particle per bacterium to at least 10. These results are consistent with the hypothesis that phenotypic resistance results from some local condition occurring within the infected host cell, which may affect one or a few virus particles. Another possibility is that occasionally in an infected bacterium, a template or pattern is laid down leading to heat resistance in a clone of phage particles formed from that template. If this occurs, the template cannot be included in the liberated phage particles since the progeny produced in the next infectious cycle are not heat resistant. There is no evidence supporting a template mechanism for phage reproduction.

If the phenotypically resistant forms are produced in response to some biochemical irregularity localized in a region of certain host cells, it might be possible to alter the frequency of phenotypically resistant particles by altering the chemical environment in which the host cells are grown. No systematic experiments along these lines have been completed.

DISCUSSION

One interesting aspect of these experiments is the parallelism in behavior of the four phage strains, T5, PB, 29 alpha and BG3.

Stocks of these four strains consistently contain a proportion of about 10^{-3} phage particles which are far more heat resistant than is the bulk of the phage population. These heat resistant particles are unable to transmit the property of heat stability to their descendants and hence they are called phenotypically heat resistant. In addition stocks of phage strain T5 contain a proportion of about 10^{-7} of heat resistant mutant particles which do transmit the property of heat resistance to their progeny. The phenotypically heat resistant phage particles are remarkably similar to the heat resistant mutant of phage T5 with respect to their rates of inactivation in 0.1 N NaCl at 50 C and also in the temperature coefficient for heat inactivation. With both genotypically and phenotypically resistant particles as well as with heat sensitive stocks, the Arrhenius constant for temperature inactivation is typical of those found in protein denaturation. Presumably the loss of infectivity is the result of the denaturation of some protein molecule essential for phage reproduction.

We have previously demonstrated that phage strains included in the T5 species are much more susceptible to heat inactivation in dilute saline than in broth; and that resistance to heat inactivation can be increased by the addition to the diluent of low concentrations of divalent cations or high concentrations of monovalent cations.

The powerful stabilizing effect of divalent cations on these bacterial viruses suggests an hypothesis to explain the greater stability of the heat resistant forms. It is possible that both phenotypically resistant and mutant phage particles contain more metal cations built into the virus particle than do the heat susceptible forms. Since a nutritional requirement for calcium ion has been demonstrated in all strains in the T5 species it is not unreasonable to suggest that calcium may be the cation which, present in various amounts, determines the heat stability of individual virus particles. By this hypothesis it is unnecessary to assume any chemical difference between a phenotypically heat resistant phage particle and a heat resistant mutant particle. They may differ only in the circumstances responsible for the introduction of extra metal cations, this being genetically controlled in the case of the mutant and environmentally controlled in the case of the phenotypically resistant particles.

SUMMARY

The heat susceptible form of phage T5 mutates to the heat resistant variant, T5st, at a rate between 10^{-7} and 10^{-8} per phage duplication.

Phenotypically heat resistant but genotypically heat susceptible

phage particles are present in all stocks of phages T5st⁺, PB, 29 alpha and BG3. No phenotypically resistant form of the heat stable mutant, T5st, has been observed. The phenotypically resistant forms occur with a frequency of about 10^{-3} in stocks in which they are present at all.

When the T5 phage yields from a limited number of bacteria are examined it is found that the majority of infected bacteria liberate no heat resistant phage particles. The distribution of the phenotypically heat resistant particles in the yields from infected bacteria is non-Poisson, indicating that conditions favoring the production of one heat resistant particle are likely to produce several in the same bacterium.

BIBLIOGRAPHY

- M. H. ADAMS. *J. Gen. Physiol.*, 1949, **32**, 579.
M. H. ADAMS. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 505.
M. H. ADAMS. *J. Immunol.*, 1951, **66**, 131.
M. H. ADAMS. *Methods in Medical Research*, 1950, **2**, 1.
Published by Year Book Publishing Co. Chicago.
M. H. ADAMS. *J. Bact.*, 1952, **64**, 387.
M. H. ADAMS, G. LARK. *J. Immunol.*, 1950, **64**, 335.
A. NOVICK and L. SZILARD. *Science*, 1951, **113**, 35.

VARIATIONS DES BACTÉRIOPHAGES CONDITIONNÉES PAR LES BACTÉRIES HÔTES (1)

par J. J. WEIGLE et G. BERTANI.

(Kerckhoff Laboratories of Biology,
California Institute of Technology, Pasadena, California
et Department of Bacteriology, University of Illinois,
Urbana, Illinois.)

On sait que par passages répétés sur certains hôtes (animaux ou plantes) les virus peuvent voir se modifier l'efficacité avec laquelle ils se multiplient sur ces hôtes ou sur d'autres. Ces variations du spectre d'action des virus ont depuis longtemps attiré l'attention des chercheurs à cause de leur importance pratique. Toutefois, malgré le grand nombre de faits décrits, le mécanisme de ces variations n'a été analysé d'une façon détaillée que dans un nombre très restreint de cas.

Les bactériophages sembleraient devoir être un excellent matériel pour l'étude de ces variations et, en fait, un mécanisme de variation faisant intervenir une ou des mutations suivies de sélection a pu être analysé avec précision. C'est celui des mutants *h* (*host range*, spectre d'action) des coliphages de la série T.

La classification des bactéries entériques par l'analyse de leur sensibilité à une série spéciale de phages (méthode dite « phage typing » ou lysotypie introduite par Craigie et Yen, 1937) a permis d'accumuler beaucoup de faits expérimentaux sur la variation du spectre d'action des phages. Mais le mécanisme de cette variation n'a pas été étudié.

Récemment, divers chercheurs ont découvert des variations du spectre d'action des phages qui ne peuvent pas s'expliquer par une mutation suivie de sélection. Nous allons résumer les divers résultats obtenus jusqu'ici pour discuter ensuite leur signification.

Commençons par les variations subies par le phage P2. Ce phage se multiplie normalement sur la souche Sh de *Shigella dysenteriae* qui sert d'indicateur pour obtenir des plages avec les

(1) Travail effectué avec l'aide des subventions de la National Foundation for Infantile Paralysis et de l'American Cancer Society (recommended by the Committee on Growth).

techniques usuelles. Si l'on essaye comme indicateur la souche B d'*Escherichia coli* on obtient très peu de plages : une quantité de P2 qui donnerait 10 000 plages sur Sh ne donne en moyenne qu'une plage sur B. Si l'on récolte les phages d'une de ces plages exceptionnelles formées sur B et qu'on les étale sur Sh et sur B, on trouve alors un nombre égal de plages sur les deux indicateurs. On en conclut que le phage des plages exceptionnelles est différent du phage original : nous l'appellerons P2B. P2B reste P2B lors de passages répétés sur B. Le fait le plus remarquable est qu'un seul passage du phage P2B sur Sh redonne du P2, avec son rapport caractéristique de 1 à 10 000 entre le nombre des plages sur B et le nombre des plages sur Sh.

Un cas très semblable a été observé par N. Bruce Collins (communication personnelle) : T1 forme exceptionnellement une plage sur *E. coli* FCb/50Br pour 1 000 000 de plages sur *E. coli* B. Et de nouveau les phages des plages exceptionnelles forment un nombre égal de plages sur B et sur l'autre indicateur. Mais il suffit d'un passage de ce phage sur B pour redonner du T1 normal. Un autre cas a été observé par M. Lieb (communication personnelle) pour un phage décrit par Kopper et Long (1952).

Puis il y a le cas du phage λ pour lequel la forme primitive est celle qui a le plus large spectre d'action. λ se multiplie également bien sur les souches S et C d'*E. coli*, mais, après multiplication sur C, le nouveau phage λ C ne forme sur S qu'une plage pour 10 000 sur C. Et de nouveau le phage de ces plages exceptionnelles se multiplie aussi bien sur S que sur C, il est redevenu du λ normal.

Il y a une correspondance complète entre les phages P2, λ C (et probablement T1) et P2B, λ (et T1 modifié) comme entre les bactéries Sh, C (et B), et B, S (et FCb/50Br). Il nous suffira donc, pour résumer, de parler de P2. Le phage P2B, exception faite de sa capacité de se multiplier normalement sur B, est complètement semblable à P2 : même spécificité antigénique, même résistance à la température et à l'irradiation ultra-violette, même adsorption sur Sh et B, même période latente. P2B, passé sur B, garde sa propriété qui le distingue de P2. Mais un seul cycle de multiplication de P2B dans une bactérie Sh suffit pour transformer dans la forme P2 la totalité (ou presque) du phage produit.

Le cas observé par Luria et Human (1952) est un peu différent. Ces auteurs ont isolé des mutants B/4₀ de la souche B, résistants au phage T4, montrant des relations inattendues avec les phages T2 et T6. Ces phages se multiplient également bien sur les souches B et Sh. Ils peuvent attaquer aussi les souches mutantes B/4₀ ; mais le phage libéré par ces souches est maintenant incapable de se multiplier sur B et sur B/4₀ : on ne peut

déceler sa présence qu'en employant Sh comme indicateur. Toutefois, cette forme nouvelle de phage, que Luria et Human ont appelée T*2 et T*6 n'est pas stable : lorsque la souche de Sh est infectée par T*, le phage produit est du phage T parfaitement typique, capable de se multiplier sur B et sur B/4₀. Une très petite proportion des bactéries B ou B/4₀ peuvent « accepter » exceptionnellement la forme T*, qui s'y multipliera ; mais ici, de nouveau, le type de phage produit dans ces cas exceptionnels est déterminé par la bactérie hôte : le phage produit par B est du type T normal ; celui produit par B/4₀ est du type T*.

Dans tous les cas décrits ci-dessus, c'est la variation du nombre de plages formées sur des indicateurs différents qui a constitué l'observation fondamentale. Sur la base de ce que l'on connaît aujourd'hui, de telles variations pourraient être dues à différentes efficacités de formation des plages sur les divers indicateurs (efficiency of plating = *eop*) ou bien à une hétérogénéité génétique de la préparation de phage employée. En effet, supposons que du phage P, préparé par lyse des bactéries d'une souche A, soit étalé sur les deux indicateurs A et B et qu'il forme moins de plages sur B que sur A. S'agit-il de différence d'*eop* ou bien P est-il hétérogène, c'est-à-dire contient-il quelques mutants, seuls capables d'attaquer B ?

Dans le premier cas, la variation serait due à toutes sortes de causes, par exemple, à une lente adsorption de P sur B ou à la nécessité pour les bactéries B d'être dans un certain état physiologique pour permettre à P de les attaquer ; mais le phage des plages formées sur A ne serait pas différent du phage des plages formées sur B. Par conséquent, il suffira de récolter le phage de n'importe quelle plage et de vérifier qu'il donne toujours la même différence d'*eop*, lorsqu'il est étalé sur les deux indicateurs, pour être certain que la situation correspond au premier cas.

Dans le deuxième cas, l'étalement de P sur B produit une sélection de mutants de P. Le phage des plages sur B diffère du phage de la plupart des plages sur A ; récolté et étalé de nouveau sur A et B, il donnera un nombre égal de plages, ou, du moins, une plus grande proportion de plages sur B que la préparation originale. Cette propriété, comme elle est d'origine mutationnelle, sera transmise à la progéniture de ce phage, indépendamment du type de bactéries, A ou B, employées pour sa multiplication. Et l'on pourra démontrer qu'il en est bien ainsi en étalant sur A et B du phage obtenu des plages formées sur A par les mutants sélectionnés sur B.

Il est bien évident que des variations d'*eop*, pas plus que des mutations du phage, ne peuvent expliquer les variations décrites ci-dessus. Dans les cas des phages P2 et λ , on a, de plus, pu

démontrer (Bertani et Weigle, 1952) l'impossibilité d'accepter l'hypothèse mutationnelle par les observations suivantes : *a*) la distribution des phages capables de former les plages exceptionnelles sur B (ou S) parmi des séries de lysats du phage P2 (ou λ C) préparé sur Sh (ou C), n'est pas clonale, comme l'on devrait s'y attendre (Luria, 1951) si les plages exceptionnelles avaient été formées par des mutants du phage présents dans les lysats ; *b*) les populations de phages libérés par des bactéries C rendues lysogènes avec λ ou λ C, ou des bactéries Sh rendues lysogènes avec P2 ou P2B, sont exactement semblables en ce qui concerne la capacité de former des plages sur B ou S.

La formation de plages exceptionnelles (par P2 sur B, ou λ C sur S) serait alors due, non plus à la présence de phages exceptionnels, mais à l'existence de bactéries exceptionnelles capables d'accepter le phage et de le multiplier en le transformant. Un certain nombre d'observations justifient cette interprétation. Ainsi, alors que le nombre des plages exceptionnelles devrait être constant dans l'hypothèse des phages exceptionnels, on trouve qu'il varie : *a*) avec l'âge de la culture indicatrice (Luria et Human, 1952) ; *b*) avec la dilution du phage étalé, de façon à donner une saturation aux concentrations plus grandes (N. Bruce Collins, communication personnelle) ; *c*) avec la pré-irradiation des cellules indicatrices par des rayons ultra-violet (Bertani et Weigle, 1952). De plus, en infectant chaque bactérie B avec au moins un phage P2 de chacun de deux types de mutants (mutation affectant la forme de la plage) et en étalant ces bactéries infectées en présence d'autres bactéries B, on a trouvé qu'une grande partie des plages (exceptionnelles donc) contenaient les deux sortes de phages.

Les variations de spectre d'action des phages, décrites ci-dessus, ne sont donc pas dues à des mutations. Par conséquent, pour expliquer ces transformations, nous devons supposer qu'il existe dans les phages une « structure » qui a les deux propriétés suivantes : *a*) sa présence est requise en quelque endroit de la chaîne de réactions nécessaire à la reproduction des phages ; *b*) sa spécificité est déterminée complètement ou presque complètement par la bactérie hôte. La réaction pour laquelle cette structure est requise a lieu après l'adsorption du phage sur la bactérie (car P2 s'adsorbe sur B comme λ C sur S). Cette réaction ne peut avoir lieu et ne peut donc permettre la reproduction des phages que si certaines conditions de compatibilité entre le phage et la bactérie hôte sont remplies. Ces conditions sont remplies par exemple par P2 ou P2B sur Sh, P2B sur B, λ ou λ C sur C, λ sur S, T2 et T6 sur B, B/4₀ et Sh, et T*2 et T*6 sur Sh seulement. Lorsque ces conditions de compatibilité ne sont pas satisfaites, la réaction n'a qu'une très petite probabilité de

réussir, cette probabilité dépendant en grande partie, ou peut-être même complètement, de l'état physiologique de la bactérie hôte (exceptionnelle alors), cas de P2 sur B, λ C sur S, T*2 et T*6 sur B et B/4₀.

Un phage ayant réussi à passer par un nouvel hôte se trouverait « adapté » à son hôte. Un tel mécanisme serait donc de nature fortement adaptative. On doit toutefois remarquer que l'un, au moins, de ces cas de variation phénotypique n'est pas adaptatif. Nous voulons parler de T2 ou T6 sur B/4₀. On se demande alors si la nature adaptative des modifications de P2, λ et T1 n'est qu'apparente. Car, en effet, les modifications qui sont adaptatives pour de nouveaux hôtes ont évidemment beaucoup plus de chance d'être découvertes expérimentalement que des modifications non adaptatives ou encore des modifications affectant d'autres caractères des phages, qui échappent aux méthodes de détection employées jusqu'ici (2). Il vaudrait peut-être la peine de chercher si d'autres caractères des phages peuvent être modifiés en faisant varier l'hôte dans lequel ils se multiplient. Il va sans dire que de telles modifications devraient être recherchées après un seul cycle de multiplication du phage dans le nouvel hôte pour éviter que ces phénomènes soient masqués par des mutations suivies de sélection.

Nous sommes heureux de remercier M. S. E. Luria et M^{me} M. L. Human, qui nous ont permis de prendre connaissance d'un manuscrit avant sa publication, et M^{me} N. Bruce Collins et M^{lle} M. Lieb, qui ont mis à notre disposition des données inédites.

BIBLIOGRAPHIE

- G. BERTANI et J. J. WEIGLE. *J. Bact.*, 1952 (sous presse).
J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Trans. Roy. Soc. Can.*, Sect. V, 1937, 79-87.
P. H. KOPPER et G. LONG. *Nature*, 1952, **169**, 331.
S. E. LURIA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 463-470.
S. E. LURIA et M. L. HUMAN. *J. Bact.*, 1952, **64**, 557-569.

(2) Les observations de M. M. H. Adams sur les variations phénotypiques de la résistance à la chaleur du phage T5 (ces *Annales*, 1953, **84**, 164) viennent à l'appui de cette hypothèse.

GENETICS OF BACTERIOPHAGE

by N. VISCONTI.

*Carnegie Institution of Washington Department of Genetics
Cold Spring Harbor, New-York.)*

It can be demonstrated by several lines of evidence that the phage particle upon entering the bacterium undergoes a profound modification into another state, in which it is unable to infect a bacterium (Hershey and Chase 1952). We will call this stage vegetative phage, and we will leave the term prophage to designate the state of phage in lysogenic bacteria (Lwoff *et al* 1950). We call vegetative phage a non infective phage in the host cell, which is actively multiplying and on the way to being transformed into mature phage.

When infected bacteria are broken up at various times during the latent period, no mature particles are found for an interval of time after infection called the eclipse period. The mature **particles** start appearing and increase linearly with time up to the moment of lysis (Doermann 1948). If lysis is delayed the accumulation of mature phage goes on linearly with time (Levinthal and Visconti 1953).

Genetical work with phage adds information to this simple picture. Let us examine the known facts which lead us to a general theory.

1. Phage can undergo mutation. Mutants are generally stable and can revert to the original type by back mutation (Luria 1945, Hershey 1946 a). Estimates of mutation rates are very approximate, due to technical difficulties (Hershey 1946 a). Mutations occur independently of each other (Hershey 1946 b). We can conclude by supposing a genetical continuity between the infecting phage and the phage in the yield. The first can also be called parental phage and the second offspring phage.

2. The analysis of a particular mutant phenotype (Luria 1951) shows that mutations occur during the multiplication of the virus, producing mutant clones which vary in size. A statistical analysis of the clone sizes leads to the conclusion that the phage as a genetical unit undergoes growth by successive binary divisions. Thus the yield of a burst can be compared to a culture of phage originating from one single infecting particle,

undergoing regular division cycles or generations. The notion of a vegetative phage particle first multiplying in the bacterial cell and maturing afterwards can account for these facts.

3. If the bacterium is multiply infected with several genetically marked phage particles, the progeny generally contains particles, which show a combination of markers derived from different parental types (Delbrück and Bailey 1946, Hershey and Rotman 1948, 1949).

4. If different ratios of marked phage particles are used for infection, the same ratios for the single markers are found in the progeny (Hershey and Rotman 1949, Visconti and Delbrück 1953). This means that there is no selection for these markers either in growth or maturation of the vegetative phage.

5. The proportions of recombinant particles in a two factor cross have different values depending on the markers. The same frequencies are obtained if crosses are made in coupling or repulsion (Hershey and Rotman 1949). Which means that loci are the segregating units. Values as high as 40 p. 100 recombinants can be obtained (Hershey and Rotman 1949). Markers showing this high recombination value are called unlinked.

If only unlinked markers are used, the different recombinant frequencies in the yield are those which should be obtained if the population of infecting phage went almost, but not quite to complete mixture or to complete statistical equilibrium through an infinite number of rounds of mating. This conclusion was reached after analyzing the results of two factor, three factor, biparental, and triparental crosses with equal or unequal multiplicities of the infecting phages (Visconti and Delbrück 1953). The notion of repeated matings among vegetative particles can account for all these results. In a random mating mendelian population this approximation to equilibrium requires at least 4 or 5 rounds of mating.

In a three factor cross involving three unlinked markers, $ABC \times abc$, if recombinants of the Ab type are selected, in this class of recombinants C and c will be distributed in the ratio 1 : 1 (Visconti and Delbrück 1953). We interpret this result as meaning that by selecting only recombinants Ab we make sure that the selected phage particles have undergone at least one mating with the opposite parent.

Many phage markers show some degree of linkage, which means a frequency of recombinants lower than 40 p. 100. If we choose a group of linked markers we find that recombination frequencies are roughly additive, which is a strong indication that the arrangement of the genes on the linkage groups is linear (Hershey and Rotman 1949, Doermann and Hill 1953). On the other hand we already know that a mixed infection of a bacterium

is not a straightforward analogue of a simple genetic cross. If we consider the phage particles in the yield as a sample of a mendelian random breeding population, then the fact that linkage is detectable means that the number of matings is not infinite. For a given number of rounds of mating the closer the linkage for a single mating, the smaller the frequency of recombinants in the final yield. Two very striking facts confirm the idea that we are dealing with a population of mating vegetative phages. The first appears from a comparison of the result of a two factor cross $AB \times ab$ (A and B linked) when the cross is made either with equal multiplicity or with very unequal multiplicity of the two infecting parental types. In the first case, speaking in a rather approximate way AB has a chance of $1/2$ of mating with ab at every round of mating. This means that half of the matings can not give recombinants Ab or aB . In contrast, in the case of very unequal multiplicity, let us suppose that AB is the minority parent, and that every bacterium has been infected by 1 AB and 20 ab . At every round of mating AB will mate with an ab , and in this case every round of mating will be useful in obtaining recombinants. If the frequency of recombinants as compared to the minority parental type (which in the first case is equal to the majority parental type) is p in the first case, it should be $2p$ in the second one. Experiments of this kind give the predicted results (Visconti and Delbrück 1953).

Another striking fact of phage genetics can be indicated under the name of *apparent negative interference* (Hershey and Rotman 1949, Doermann and Hill 1953). Let us consider three linked factors ABC . Let the recombination frequency between A and B in a cross $AB \times ab$ be p . We can now repeat the cross using a third marker C closely linked to B . If we select recombinants Be , and score the frequency of recombinants aB only within this class, then this value is greater than p . This means that recombination, between B and C increases the probability of recombination between A and B . In conventional breeding tests, this result would be called negative interference. Visconti and Delbrück (1953) have shown that this result is a consequence in population genetics of any type of successive mating, if mating is not in synchronous rounds, but if its frequency has some kind of distribution per single particle. Supposing each particle has the same probability of mating per time unit, after a period of time, some particles will have mated more than others the closer the linkage between B and C , the rarer will be the recombinants. If we choose these recombinants we select those particles which have undergone more mating.

6. Although in a two factor cross the number of recombinants of the complementary type are equal in yields averaged over

many bacteria, in a single burst there is no correlation between the frequencies of the two recombinants (Hershey and Rotman 1949). This shows that formation of a mature recombinant particle is a process independent of the formation of the complementary one. This lack of correlation can be explained, at least in part, by assuming that vegetative phage particles are extracted at random from the pool of mating particles, and after becoming mature phage particles, they are accumulated in the bacterium.

7. Rare recombinants do not appear in clones in the yields from single bacteria. Their number in different bursts forms a nearly random distribution (Hershey and Rotman 1949). This shows that recombinants appear late in the course of multiplication. We can assume that vegetative phage undergoes a period of multiplication without or with very little mating. We also assume that the vegetative population multiplies by simple division until a high density is reached before mating becomes frequent.

8. Two lines of evidence indicate that in the vegetative phage population there is a drift towards genetic equilibrium. On the one hand in crosses involving unlinked markers it is found that the fraction of recombinants in the yield increases from 34 p. 100 to 42 p. 100 when the mature progeny is sampled by artificial premature lysis at various times during the latent period (Doermann 1953). The genetic equilibrium lies at 50 p. 100 recombinants, and the approach to this equilibrium can be satisfactorily accounted for by the theory of a mating vegetative phage population. On the other hand, in crosses involving closely linked factors, the frequency of recombinants can be greatly increased by inhibiting the lysis. During this prolonged intracellular phase, both the proportion of recombinants among the mature particles and the burst size increase linearly with time; at 70 minutes after infection both values become constant (Levinthal and Visconti 1953).

A theory of phage genetics (Visconti and Delbrück 1953) can now be expressed in the following terms. The parental particles enter the bacterial cell and are transformed into vegetative phage particles. These multiply, and as they multiply the rate of mating becomes appreciable. At a certain moment, shortly after mating has begun, vegetative phage particles are randomly sorted out at a constant rate and then transformed into mature phage particles which accumulate in the bacterium. Maturation is irreversible in the mother cell; mature phage particles do not mate and do not grow.

The accumulation of mature phage goes on linearly with time up to the moment of lysis. Lysis can be induced artificially at

any moment from 10 minutes to 60 minutes. The progeny examined at the time of lysis consists of a mixture of samples withdrawn at various times from the mating pool.

This theory places the genetics of phage very much in line with classical mendelian theory which has been worked out for higher organisms. The difference with higher organisms consists mainly in the fact that we cannot study directly the recombination from a single mating. Only by applying the methods of population genetics, can we calculate the recombination values per single mating and thus build the linkage maps. In these linkage maps interference is either absent or very small.

One aspect of phage genetics which has not been accounted for by this theory is the work of Hershey and Chase (1951) on heterozygous phage particles in the progeny. About 2 p. 100 of the progeny from a bacterium infected with equal input of two marked parents are heterozygous with respect to any given factor. At first sight one is tempted to interpret this result by assuming that a certain random fraction of the zygotes of vegetative phage particles in the mating pool mature without segregating. In two factor crosses this leads to the prediction that heterozygosis with respect to one of the two factors should be strongly correlated with heterozygosis with respect to the other factor. In contradiction with this Hershey finds zero correlation when the two factors are unlinked. Only when the factors are closely linked does some correlation appear. One way of explaining this result would be to assume very frequent small duplications of the linkage structures. These duplications should be small enough in order to account for the lack of correlation every time the two factors are not very closely linked. On the other hand they should be frequent enough to account for the 2 p. 100 heterozygous at any given locus. Practically every phage should carry some of these duplications. This explanation is not very satisfactory; at the present moment it would be better to say that we are still waiting for an interpretation of this phenomenon.

REFERENCES

- A. H. DOERMANN. *Carnegie Institution of Washington Yearbook*, 1948, **47**, 176-186.
A. H. DOERMANN, 1953 (in press).
A. H. DOERMANN and M. B. HILL, 1953 (in press).
M. DELBRÜCK and W. T. BAILEY. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1946, **11**, 33-37.
A. D. HERSHEY. *Genetics*, 1946 a, **31**, 620-640.
A. D. HERSHEY. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1946 b, **11**, 67-76.

- A. D. HERSHEY and M. CHASE. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 471-479.
- A. D. HERSHEY and M. CHASE. *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 39-56.
- A. D. HERSHEY and R. ROTMAN. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1948, **34**, 89-96.
- A. D. HERSHEY and R. ROTMAN. *Genetics*, 1949, **34**, 44-71.
- C. LEVINTHAL and N. VISCONTI, 1953 (in press).
- S. E. LURIA. *Genetics*, 1945, **30**, 84-99.
- S. E. LURIA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 463-470.
- A. LWOFF, L. SIMINOVITCH and N. KJELDGAARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 815-859.
- N. VISCONTI and M. DELBRÜCK. *Genetics*, 1953 (in press).

ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU BACTÉRIOPHAGE AU MOYEN D'IRRADIATIONS PAR LA LUMIÈRE ULTRA-VIOLETTE (1)

par S. BENZER (2) et F. JACOB.

(Institut Pasteur. Service de Physiologie microbienne.)

INTRODUCTION.

On peut essayer d'étudier la suite des événements qui se déroulent entre le moment de l'infection d'une bactérie par un bactériophage et celui où les phages nouvellement formés sont libérés par la lyse bactérienne, en analysant, au cours de la période latente, les variations de la résistance à la lumière ultra-violette (U.V.) du complexe phage-bactérie. Cette méthode, due à Luria et Latarjet (1947), comporte les étapes suivantes :

1° Les bactériophages sont adsorbés sur les bactéries sensibles. Les phages non adsorbés sont éliminés.

2° Au cours de la période latente, des échantillons sont prélevés à des temps bien déterminés.

3° Chacun des échantillons est irradié avec différentes doses d'U.V. Après étalement on mesure le nombre des centres infectieux survivants, c'est-à-dire le nombre des bactéries infectées donnant une plaque. Puis on établit la courbe de survie, en portant en abscisse la dose d'U.V. et en ordonnée, sur une échelle logarithmique, la fraction des centres infectieux survivants.

Cette méthode peut être appliquée à l'étude des bactéries lysogènes inductibles. Dans ce cas, le développement du phage est provoqué par une dose initiale d'U.V.

Cette méthode a fait récemment l'objet d'une revue de Latarjet (1952). Dans ce mémoire, nous résumerons les résultats obtenus jusqu'ici par l'étude des phages virulents ou des phages tempérés et nous discuterons les interprétations que l'on peut en donner.

(1) Travail effectué grâce à une subvention du *National Cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

(2) Fellow of the Fulbright Commission and the American Cancer Society. Adresse actuelle : Purdue University, Lafayette, Indiana, USA.

COMPOSANTS DU COMPLEXE AVANT L'INFECTION.

Dans les expériences de ce genre, on étudie un système résultant de l'association de deux composants initiaux, dont on peut au préalable déterminer séparément les propriétés.

1° Si l'on irradie des *phages* libres, la fraction des survivants

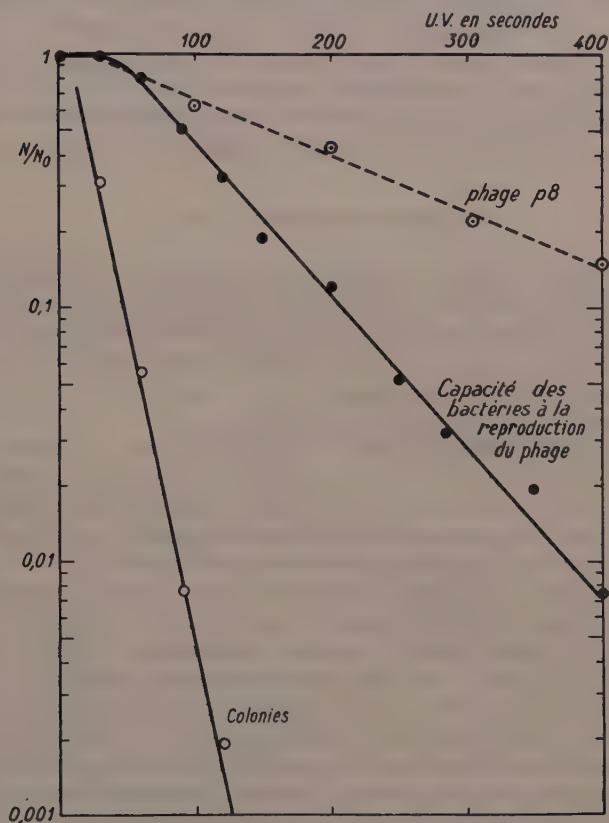


FIG. 1. — Capacité de *P. pyocyanea* 13 à reproduire le phage p8. Les bactéries sont irradiées avec différentes doses d'U.V. puis infectées. Nombre moyen de phages par bactérie : $5 \cdot 10^{-3}$. En abscisse, la dose d'U.V. en secondes. En ordonnée, la fraction des bactéries infectées donnant une plage, sur une échelle logarithmique. On a représenté également la courbe de survie du phage p8 libre, et la courbe de survie des bactéries mesurée par leur aptitude à former une colonie.

décroît de façon approximativement exponentielle avec la dose. La courbe de survie est donc linéaire et la pente de cette courbe est caractéristique du phage.

2° L'effet de l'irradiation sur la *capacité de la bactérie à assurer le développement d'un phage* ajouté ultérieurement (« capacité ») peut également être recherché. On obtient alors une courbe caractéristique du système étudié. Cette courbe est différente, en général, de la courbe de survie des bactéries, mesurée par la possibilité de former des colonies. Dans certains systèmes tels que T2 sur *Escherichia coli* B (Anderson, 1948), T7-*E. coli* B et λ -*E. coli* C, la « capacité » est beaucoup moins sensible à l'action des U.V. que le phage libre. Il n'en est cependant pas toujours ainsi, et l'on voit sur la figure 1 que la « capacité » de *Pseudomonas pyocyanea* 13 à reproduire le phage p8 est beaucoup plus sensible à l'action des U.V. que le phage p8 lui-même.

COMPLEXE PHAGE-BACTÉRIE.

Après l'adsorption du phage sur la bactérie, les deux composants initiaux forment un système nouveau, le « complexe » qui est ensuite irradié comme un tout. La résistance aux U.V. de chacun des composants peut alors être modifiée par certains effets, tels qu'une protection du phage due à l'absorption des U. V. par la bactérie ou des effets photodynamiques.

Une fois le développement du phage amorcé, le système subit des transformations qui sont susceptibles d'engendrer des modifications de la résistance aux U.V. La « survie » du complexe est définie par la capacité de produire une plaque après étalement. Elle est sous la dépendance de nombreux facteurs.

a) S'il existe une série d'éléments, *tous nécessaires* à la production éventuelle d'un phage, l'inactivation de n'importe lequel de ces éléments suffit pour inactiver le complexe. Ainsi, la sensibilité aux U.V. du complexe est la somme des sensibilités individuelles de ces éléments. Si les éléments présentent des résistances très différentes, la survie du complexe sera déterminée par l'élément *le plus sensible*. Les éléments moins sensibles, au contraire, ne seront pas mis en évidence. Comme exemple d'une telle série d'éléments, on peut envisager une suite de transformations successives, dont chacune dépendrait d'une réaction différente.

b) S'il existe plusieurs éléments indépendants, dont *un seul est suffisant* pour la production d'un phage, la survie de n'importe lequel de ces éléments assurera la survie du complexe. Ces éléments peuvent être homogènes au point de vue de leur sensibilité aux U.V., comme dans le cas d'une descendance de phages mûrs intrabactériens, ou hétérogènes, dans le cas, par exemple, de la coexistence d'un phage de la descendance et d'un système formateur de phages. Si les éléments présentent des résistances nettement différentes à l'action des rayons U.V., la survie du

complexe sera déterminée par la survie de l'élément *le plus résistant*. Si les divers éléments sont identiques, la courbe de survie affectera la forme d'une courbe à *cibles multiples* dont la pente finale correspond à la sensibilité de chacun des éléments pris séparément.

La situation décrite dans le paragraphe *a* doit surtout correspondre au début de la période latente et peut se traduire par les changements de pente dans la courbe de survie. Les considérations *b*, au contraire, doivent être valables pour la fin de la période latente, quand apparaissent les éléments multiples. Toutefois, il est bien évident que les situations *a* et *b* peuvent se combiner à n'importe quel moment de la période latente et que l'on doit s'attendre à obtenir des courbes de survie complexes.

RÉSULTATS.

Les études concernant les phages virulents seront brièvement résumées, car les résultats en ont déjà été publiés. Au contraire, les résultats obtenus avec les phages tempérés étant encore inédits seront décrits de façon plus détaillée.

I. — Etude des phages virulents.

On peut, tout d'abord, comparer les deux phages T7 et T2, actifs sur *E. coli* B, qui diffèrent notablement, et par leur morphologie, et par le fait que le phénomène de réactivation par multiplicité (Luria, 1947 ; Luria et Dulbecco, 1949) n'existe que dans le cas de T2. Pour chacun de ces phages, la « capacité » d'*E. coli* B est extrêmement résistante à l'action de l'U.V.

Phages T7 sur E. coli B (Benzer, 1952). — Sur la figure 2, on voit qu'à temps zéro, c'est-à-dire immédiatement après l'infection, le complexe a la même résistance que le phage libre. A mesure que le développement du phage se poursuit, les courbes présentent des « épaules » de plus en plus importantes, mais la pente finale des courbes reste analogue à celle de la courbe à temps zéro. Ceci correspond à une augmentation de la multiplicité d'éléments indépendants ayant la même sensibilité aux U.V. que le phage libre.

L'ensemble de ces courbes représente le tableau le plus simple que l'on puisse attendre d'une pareille étude. La méthode met en évidence la multiplication de quelque chose à l'intérieur de la bactérie pendant la phase latente. Ce résultat est important, car il montre que la situation la plus simple peut effectivement exister et être décelée par cette méthode.

Phage T2 sur *E. coli* B (Luria et Latarjet, 1947 ; Benzer, 1952).
 — Les résultats concernant ce phage sont présentés sur la figure 3.
 A temps zéro, le complexe a une résistance approximativement

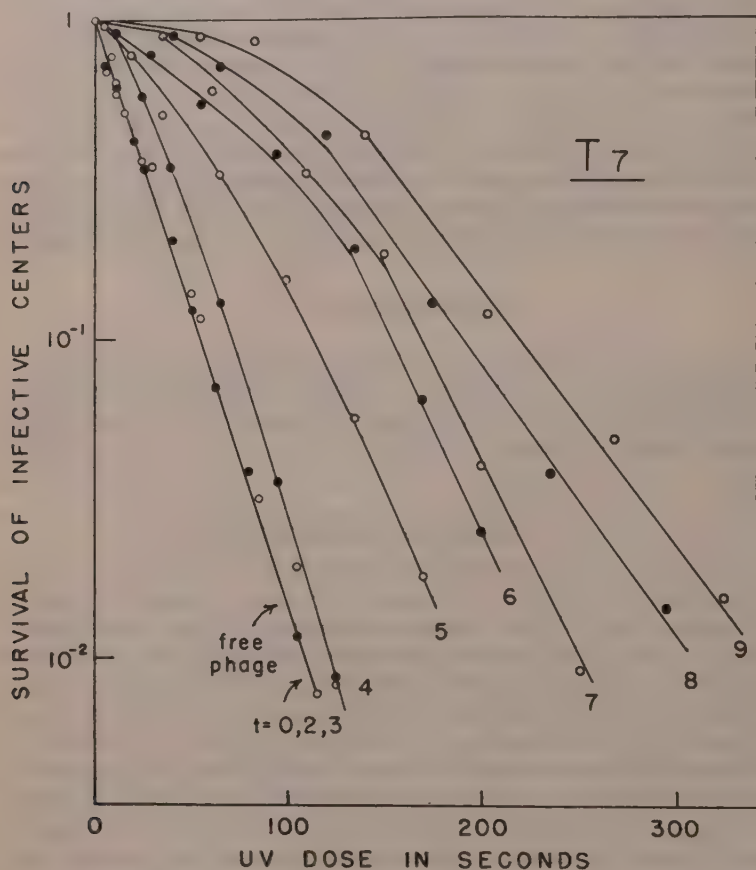


FIG. 2. — Courbes de survie des complexes *E. coli* B-T7, irradiés à des temps différents au cours de la période latente. Bactéries carencées, infectées en tampon. Addition de bouillon à temps zéro. Chaque courbe est désignée par le temps en minutes écoulé après l'addition du bouillon. Expérience à 37°. Période latente : douze minutes. Nombre moyen de phages par bactérie : 1.10^{-2} .

égale à celle du phage libre. Ultérieurement on observe des modifications très différentes de celles trouvées avec T7. Pendant la première moitié de la période latente, il y a une augmentation considérable de la résistance du complexe. Puis la résistance

diminue et la courbe devient à « cibles multiples ». Latarjet (1948) a repris cette étude avec les rayons X et a obtenu des variations de résistance de caractères analogues, mais d'amplitudes différentes.

★ ★

La comparaison des résultats obtenus avec T2 et avec T7 montre qu'il doit évidemment exister d'importantes différences dans le

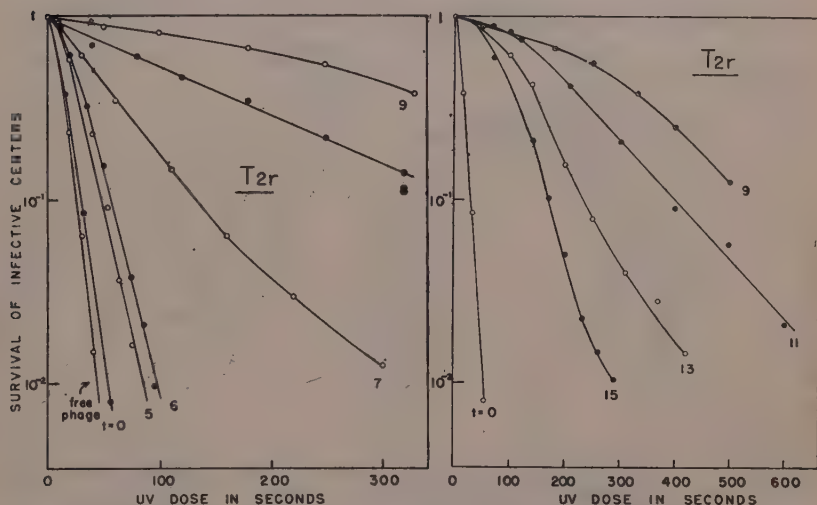


FIG. 3. — Courbes de survie des complexes *E. coli* B-T2, irradiés à des temps différents au cours de la période latente. Bactéries carencées, infectées en tampon. Addition de bouillon à temps zéro. Chaque courbe est désignée par le temps en minutes écoulé après l'addition du bouillon. Expérience à 37°. Période latente : dix-neuf minutes. Multiplicité de l'infection : 2×10^{-2} .

mode de reproduction de ces deux phages. L'interprétation de ces résultats sera discutée après l'étude des phages tempérés.

II. — Etude des phages tempérés.

Dans le cas des phages tempérés inductibles, il est possible d'étudier le développement du même phage dans deux systèmes différents : 1° chez une bactérie sensible infectée par le phage et, 2° chez une bactérie lysogène induite à former du phage. La méthode offre donc la possibilité d'obtenir des renseignements sur l'état du ou des « prophages », par comparaison des résultats

obtenus sur les deux systèmes. Ceci en faisant l'hypothèse que le rôle des bactéries pendant le développement d'un même phage est analogue dans les deux systèmes.

Phage λ sur E. coli C (Benzer et Jacob, résultats inédits). — La taille du phage λ est comparable à celle de T2 (Weigle et Delbrück, 1951). Il ne présente pas le phénomène de réactivation par multiplicité (Weigle, communication personnelle). La « capacité » des bactéries *E. coli C* est très résistante à l'action de l'U.V.

La figure 4 représente les courbes obtenues avec les complexes

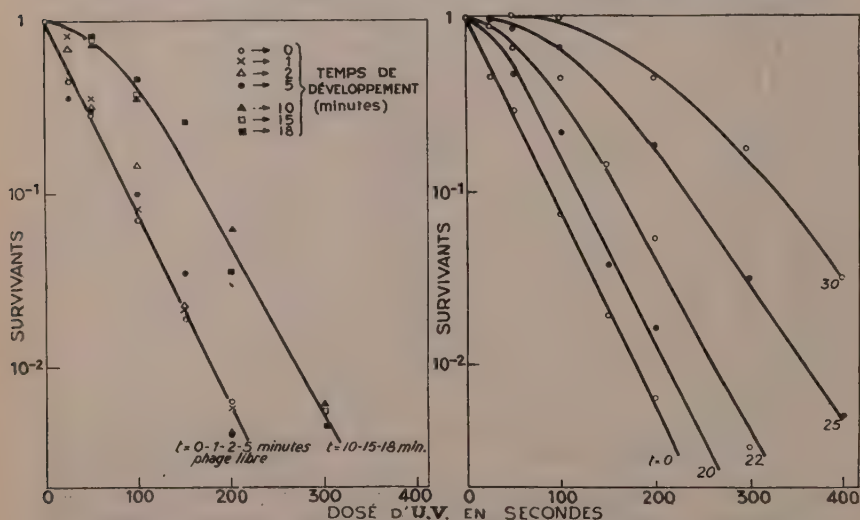


FIG. 4. — Courbes de survie des complexes *E. coli C* infectés par λ , irradiés à des temps différents au cours de la période latente. Bactéries infectées en présence de KCN puis lavées et remises en suspension dans du bouillon. Chaque courbe est désignée par le temps en minutes écoulé après la reprise des bactéries en bouillon. Expérience à 37°. Période latente : quarante-cinq minutes. Nombre moyen de phages par bactérie : 8.10^{-3} .

formés par infection d'*E. coli C* avec λ . A temps zéro, la résistance du complexe est analogue à celle du phage libre. Les courbes, dans leur ensemble, sont assez comparables à celles obtenues avec T7. Il y a, en effet, des changements de la multiplicité mais non de la pente. Toutefois, λ présente des phénomènes, que l'on n'observe pas avec T7 et qui se traduisent par une diminution suivie d'une remontée de la multiplicité à la fin de la première moitié de la période latente.

Sur la figure 5 sont représentées les courbes obtenues avec

une souche lysogène de *E. coli* C (λ). Le développement du phage est provoqué par une dose initiale de rayons U.V. qui induit plus de 90 p. 100 des bactéries. A temps zéro, la pente de la courbe correspond à une résistance quelque peu inférieure à celle du phage libre. Ultérieurement, l'allure générale des courbes devient comparable à celles que l'on observe chez les bactéries sensibles infectées (fig. 4), ceci, toutefois, à condition de tenir compte, dans le cas des bactéries lysogènes, de la dose initiale

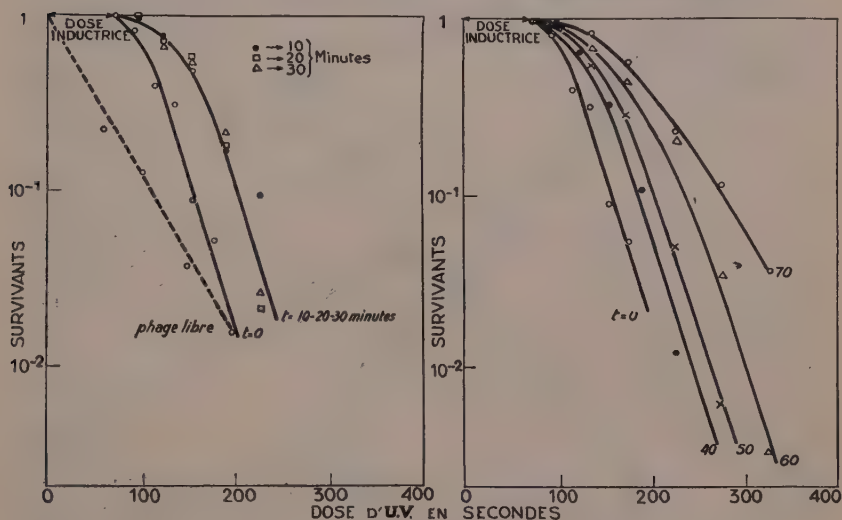


FIG. 5. — Courbes de survie des complexes lysogènes induits C (λ) irradiés à des temps différents au cours de la période latente. Bactéries induites en tampon par une dose initiale de soixante-quinze secondes. Addition de bouillon à temps zéro. Chaque courbe est désignée par le temps en minutes écoulé après l'addition du bouillon. Expérience à 37°. Période latente : soixante-cinq minutes. Bactéries induites par la dose initiale : 92 p. 100.

qui a servi à induire le développement du phage. Chez les bactéries lysogènes induites, le développement du phage est plus lent que chez les bactéries sensibles infectées ; ceci pourrait être dû aux perturbations apportées par l'irradiation inductrice.

Ces résultats montrent que λ ne se comporte, ni comme T7, ni comme T2, mais qu'il est cependant plus comparable à T7 qu'à T2 quant aux variations de résistance aux U.V. Ils montrent, en outre, qu'il n'y a pas de différence importante de la résistance aux U.V. entre les bactéries sensibles infectées et les bactéries lysogènes induites.

Phage p8 sur *P. pyocyanea* 13 (Jacob, résultats inédits). —

Les propriétés de la souche 13 et du phage p8 ont été précédemment décrites (Jacob, 1952). Le phage p8 est un assez gros phage, de taille comparable à celle de T2 (G. et E. Kellenberger, communication personnelle). Il ne donne pas le phénomène de réactivation par multiplicité. Dans ce système la « capacité » des

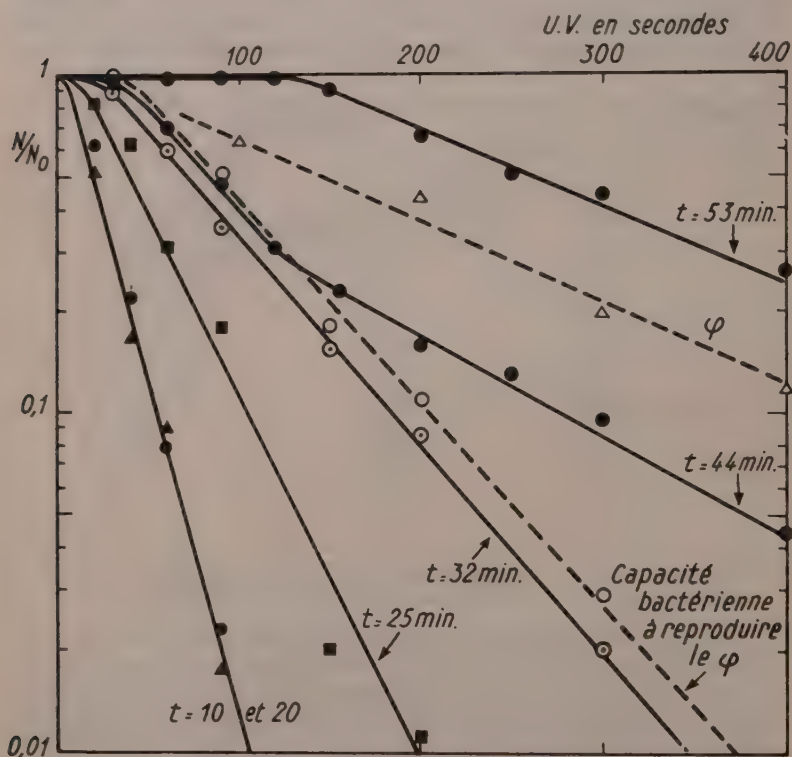


FIG. 6. — Courbes de survie des complexes *P. pyocyanea* 13 infectés par p8, irradiés à des temps différents au cours de la période latente. Bactéries infectées en tampon puis lavées et remises en suspension dans du bouillon. Chaque courbe est désignée par le temps en minutes écoulé après la reprise des bactéries en bouillon. Expérience à 37°. Période latente : soixante-cinq minutes. Nombre moyen de phages par bactérie : $5 \cdot 10^{-3}$.

bactéries à produire du phage est beaucoup plus sensible à l'action des U.V. que le phage libre (voir fig. 1).

La figure 6 représente les courbes obtenues en irradiant les complexes formés par infection de la souche sensible. Après l'infection, la courbe de survie du complexe se situe au-dessous de la courbe de survie du phage libre et de la courbe exprimant

la « capacité » des bactéries. Aussitôt formé, le complexe est donc beaucoup plus sensible à l'action des U.V. que le phage libre et que la « capacité » des bactéries irradiées séparément. Cette sensibilité persiste pendant le premier tiers de la période latente, puis la résistance du complexe augmente et rejoint celle

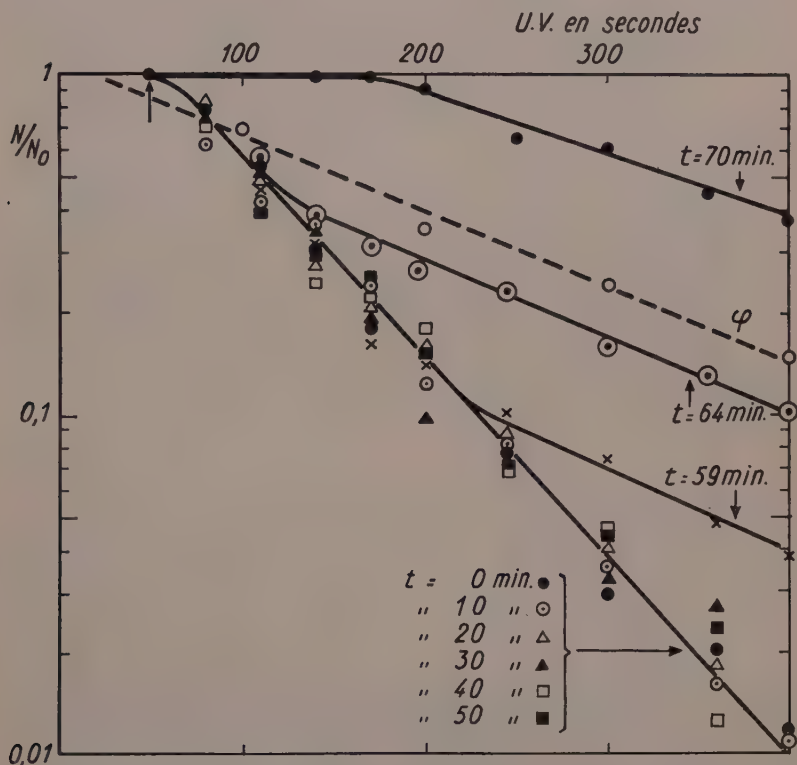


FIG. 7. — Courbes de survie des complexes lysogènes induits 13 (8) irradiés à des temps différents au cours de la période latente. Bactéries induites en tampon par une dose initiale de cinquante secondes. Addition de bouillon à temps zéro. Chaque courbe est désignée par le temps en minutes écoulé après l'addition du bouillon. Expérience à 37°. Période latente : quatre-vingt-cinq minutes. Bactéries induites par la dose initiale : 95 p. 100.

de la « capacité » des bactéries. On n'observe alors aucun changement, jusqu'au moment où apparaissent les premiers phages intrabactériens que l'on peut mettre en évidence par la technique au cyanure de Doermann (voir fig. 8). A ce moment, la « queue » de la courbe devient parallèle à la courbe de survie du phage libre et, ultérieurement, la multiplicité des courbes de survie des

complexes augmente progressivement. La multiplicité déterminée d'après ces courbes est comparable au nombre moyen de phages trouvés au même instant dans une bactérie par la méthode au cyanure (fig. 8).

Pour une souche lysogène 13 (8), les courbes de survie des complexes sont données sur la figure 7. A temps zéro après expo-

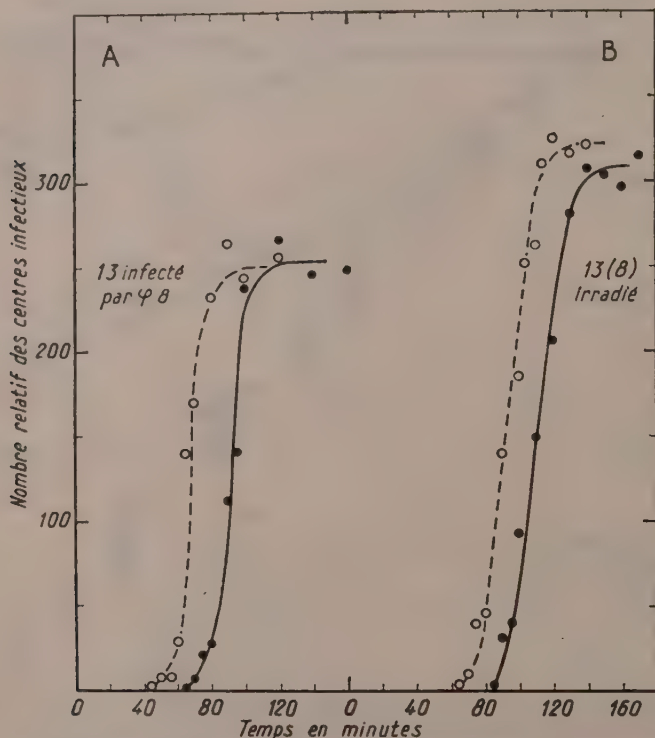


FIG. 8. — Libération de phages spontanée et provoquée par le cyanure chez *P. pyocyanea* 13 infecté par p8 et chez *P. pyocyanea* 13 (8) induit. Les traits pleins représentent la libération spontanée de phages. Les pointillés représentent la libération de phages chez les bactéries traitées par le KCN. Les résultats chez 13 infecté par 8 ont été obtenus au cours de l'expérience représentée sur la figure 6. Les résultats chez 13 (8) au cours de l'expérience représentée sur la figure 7.

sition des bactéries à la dose inductrice d'U.V., la courbe de survie des complexes est à peu près identique à la courbe représentant la « capacité » des bactéries sensibles 13 à reproduire le phage p8. Pendant la plus grande partie de la période latente, aucun changement ne survient jusqu'à l'apparition des premiers phages intrabactériens (voir fig. 8). Approximativement à ce

moment, la « queue » de la courbe devient parallèle à la courbe de survie du phage. Ultérieurement, comme dans le cas de la souche sensible infectée, la multiplicité de la courbe s'accroît avec le nombre moyen de phages trouvés par bactérie. Ainsi que pour le phage λ , les perturbations apportées aux bactéries par la dose inductrice de rayons U. V. ralentissent peut-être le développement du phage p8. En effet, la période latente des complexes formés en infectant des bactéries sensibles préalablement irradiées avec la dose inductrice est approximativement la même que celle des bactéries lysogènes induites.

L'étude de ce nouveau système conduit donc à des résultats très différents de ceux obtenus chez les trois autres. La principale différence est due au fait que chez *P. pyocyanea* la « capacité » des bactéries détermine la sensibilité des complexes pendant la plus grande partie de la période latente et agit comme un rideau qui masque d'éventuelles variations de la sensibilité propre du phage. Quoi qu'il en soit, il existe une différence importante entre les complexes lysogènes induits et les complexes obtenus par infection, puisque l'on n'observe pas chez les bactéries lysogènes la chute de résistance et la remontée progressive observées pendant la première moitié de la période latente chez les bactéries sensibles infectées.

RENSEIGNEMENTS FOURNIS PAR L'ÉTUDE DES SYSTÈMES LYSOGÈNES. — La comparaison des résultats obtenus avec la souche sensible infectée et avec la souche lysogène induite peut apporter des renseignements sur l'état et le nombre des prophages. Supposons, par exemple, que la pente de la courbe de survie du complexe lysogène irradié à temps zéro corresponde à l'une des courbes de survie observée à une certaine étape du développement sur le complexe infecté ; si, de plus, la suite des changements est identique dans les deux types de complexes, il est probable que le prophage correspond à l'un des états par lesquels passe successivement le phage pendant son développement chez les bactéries sensibles infectées. Si, au contraire, la résistance du complexe lysogène à temps zéro est différente de toute la série des résistances observées sur le complexe infecté, ou bien si la succession des changements est différente après induction et après infection, on pourra conclure que le prophage est dans un état différent des états du phage pendant son développement chez les bactéries sensibles.

Malheureusement, aucun des deux systèmes lysogènes étudiés n'a permis de vérifier l'une ou l'autre de ces hypothèses. Dans le cas de *P. pyocyanea* et du phage p8, il est clair que le prophage ne se trouve pas dans le même état que le phage infectant à temps zéro. En effet, la résistance du prophage est au moins

égale à celle de la « capacité » des bactéries, tandis que la résistance du complexe infecté est beaucoup plus faible pendant le premier tiers de la période latente. Mais puisque, chez les bactéries lysogènes induites, la « capacité » masque la résistance du prophage et ses variations, il est impossible, d'une part, de savoir quelle est exactement la résistance du prophage à temps zéro, et, d'autre part, quelle est l'évolution de la résistance pendant le développement du phage. Ceci aussi bien chez les bactéries lysogènes induites, que chez les bactéries sensibles infectées. Dans le cas de *E. coli* C et du phage λ , les changements de résistance sont trop faibles pour permettre une conclusion.

La chute de résistance des complexes, immédiatement après l'infection de *P. pyocyanea*, est un phénomène qui n'avait pas été observé jusqu'ici avec d'autres phages. Des hypothèses variées pourraient rendre compte de ce phénomène, mais elles seraient purement gratuites. Il ne faut pas oublier que l'infection des bactéries par des phages tempérés peut conduire à l'établissement de systèmes lysogènes et que l'on ne sait pas encore comment s'effectue la « réduction » du phage en prophage. De très petites doses de rayons U. V. peuvent peut-être modifier le complexe dans ce sens. J. Weigle (communication personnelle) a récemment observé que des phages λ irradiés par les rayons U. V., puis étalés sur *E. coli* C, donnaient un nombre de plages plus important si les bactéries avaient été préalablement irradiées par de petites doses de rayons U. V. que si elles n'avaient pas été irradiées. Tout se passe comme si la lésion causée au phage par les U. V. était compensée par l'irradiation de la bactérie.

Ceci montre avec quelles précautions on doit interpréter les courbes de survie des complexes, quand il s'agit de systèmes susceptibles de donner des bactéries lysogènes.

Discussion.

Dans les expériences décrites, le critère des effets de l'U. V. est toujours la survie du pouvoir de former une plaque. La formation d'un centre infectieux, qui en est la condition, ne survient qu'à la fin d'une série de réactions exigeant la participation du phage infectant et de la bactérie. L'irradiation du complexe ou d'un des composants peut détruire un élément nécessaire à l'accomplissement ultérieur d'une ou plusieurs de ces réactions, ce qui entraîne l'avortement du système : le complexe évolue jusqu'à un stade correspondant à la première des réactions inhibées. Si ces réactions présentent différentes

résistances aux U. V., la sensibilité du complexe sera la somme des sensibilités individuelles, comme on l'a vu dans l'introduction. Si un complexe est irradié après que certaines réactions sensibles ont déjà eu lieu, ces réactions n'ayant plus de rôle à jouer, leur sensibilité n'affectera plus la sensibilité du complexe.

Un exemple d'une telle réaction qui concerne la participation bactérienne est fourni chez *P. pyocyanea* par la « capacité » des bactéries : l'étude de cette « capacité » révèle l'existence d'une réaction qui peut être inhibée par l'irradiation de la bactérie avant l'infection. Comme le montrent les courbes de survie au moment de l'apparition des phages de la descendance, la résistance d'une fraction des complexes correspond encore à la « capacité », tandis que la résistance de l'autre fraction correspond déjà à celle du phage. Il est donc clair que la réaction limitante, exprimée par la « capacité », contrôle une étape très tardive dans le développement du complexe. Dès qu'il existe un phage mûr dans la bactérie, capable de produire une plage, la survie du complexe n'est plus limitée par cette réaction.

De la même façon, l'irradiation du phage avant l'infection peut bloquer son développement futur à un stade particulier. Pour une variété de phage donnée, les changements de résistance pendant le développement dépendront du nombre des réactions et de leurs sensibilités respectives.

Le tableau des courbes obtenues avec T7 pourrait se comprendre de la manière suivante : l'U. V. agirait sur les complexes en inhibant surtout une étape particulièrement sensible du développement du phage, située juste avant l'apparition d'éléments indépendants semblables au phage. Si ce stade était tardif, les complexes présenteraient toujours la même résistance avant d'atteindre ce stade. Cette résistance serait la même que celle du phage libre, car en irradiant celui-ci, on détruirait le pouvoir du phage à accomplir ultérieurement cette réaction. C'est donc toujours la sensibilité de la même réaction qui serait mise en évidence par l'irradiation du phage libre ou du monocomplexe. Lorsque les phages de la descendance apparaissent, là encore, c'est leur capacité à produire une plage après irradiation qui sera éprouvée. Ainsi la famille de courbes montrera seulement des augmentations de la multiplicité.

Dans le cas de T2, au contraire, le fait que, pendant toute la première partie de la période latente, la résistance du complexe augmente progressivement, indique que, au cours du développement de ce phage, il existe plusieurs réactions sensibles aux U. V. Si le complexe est irradié à des temps variables de la période latente, la résistance augmente à mesure que des étapes sensibles sont franchies. Avec T2, il n'est pas possible d'observer

l'augmentation de la multiplicité due à l'apparition des phages de la descendance, car leur sensibilité est très grande en comparaison de celle du système formateur de phages et la survie du complexe est alors déterminée par la survie de l'élément le plus résistant.

Ces considérations suggèrent un rapprochement entre les changements de résistance aux rayons U. V. et les phénomènes de réactivation par multiplicité présentés par T2, mais non par T7. Supposons qu'une bactérie soit infectée par deux phages T2 inactivés de façon telle que, chez chacun des phages, les lésions correspondent à des réactions différentes (fig. 9). On peut envisager que les réactions auxquelles un phage a perdu le pouvoir de participer sont accomplies grâce au pouvoir intact

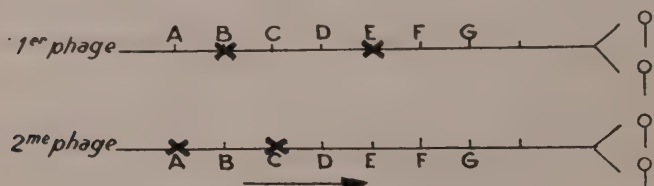


FIG. 9. — Schéma de la réactivation par multiplicité. La bactérie est infectée par deux phages dont le premier a perdu le pouvoir de participer aux réactions B et E, le second aux réactions A et C. Le produit de chacune des réactions pouvant être utilisé par les deux phages, tous deux arrivent à maturation.

de l'autre phage et que le produit de ces réactions peut être utilisé par les deux phages. Donc, si chacune des réactions est potentiellement intacte dans un phage au moins, chacun des phages participant au système arrivera à maturation.

Dans le cas de T7, si tous les phages inactivés par les U. V. perdent le pouvoir de participer à la même réaction, il n'y a pas de suppléances, donc pas de réactivation par multiplicité.

Cette conception n'exige pas la présence d'unités génétiques se multipliant indépendamment comme le veut la théorie formulée par Luria et Dulbecco, mais elle conduit à des prédictions statistiques analogues. Elle se heurte aux mêmes critiques quantitatives (Dulbecco, 1952).

Cette conception pourrait également permettre d'interpréter les phénomènes relatifs à la photorestauration des bactériophages irradiés (Dulbecco, 1950). L'infectivité d'un phage inactivé par les rayons U. V. n'est pas restaurée par la lumière visible aussi longtemps que le phage reste libre. Elle devient restaurable seulement après la pénétration du phage dans la bactérie. On peut admettre que la photorestauration ne consiste pas en une répa-

ration directe de la lésion originale, mais qu'elle permet seulement au complexe, dont l'évolution est arrêtée à la réaction inhibée, d'effectuer cette réaction. Une fois la réaction accomplie, le complexe pourrait poursuivre son évolution, sauf dans les cas où le phage aurait subi d'autres lésions qui inhiberaient des réactions ultérieures.

Quoi qu'il en soit, il existe une relation étroite entre les résultats des expériences mettant en œuvre l'irradiation des phages ou des complexes par la lumière ultra-violette : variations de la résistance au cours de la période latente, réactivation par multiplicité et photorestauration. Il semble que l'étude de ces phénomènes fournisse des données qui pourront éventuellement permettre d'analyser les différentes réactions intervenant dans la reproduction du phage.

Même si ces réactions sont inconnues, on peut utiliser les changements de résistance des complexes comme index du développement du phage dans des conditions spécifiques. Un exemple en est donné dans l'appendice.

BIBLIOGRAPHIE

- T. F. ANDERSON. *J. Bact.*, 1948, **56**, 403-410.
S. BENZER. *J. Bact.*, 1952, **63**, 59-72.
A. H. DOERMANN. *Carnegie Institution of Washington Yearbook*, 1948, **47**, 176-186.
R. DULBECCO. *Nature*, 1949, **163**, 949.
R. DULBECCO. *J. Bact.*, 1950, **59**, 329-347.
R. DULBECCO. *J. Bact.*, 1952, **63**, 199-207.
F. JACOB. *Ces Annales*, 1952, **82**, 433-458.
R. LATARJET. *J. Gen. Physiol.*, 1948, **31**, 529-546.
R. LATARJET. In « Symposium on Nature of Virus Multiplication, Oxford », 1952 (*sous presse*).
S. E. LURIA. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1947, **33**, 253-264.
S. E. LURIA et R. DULBECCO. *Genetics*, 1949, **39**, 93-125.
S. E. LURIA et R. LATARJET. *J. Bact.*, 1947, **53**, 149-163.
J. J. WEIGLE et M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301-318.

APPENDICE

ADSORPTION DE BACTÉRIOPHAGES, SANS DÉVELOPPEMENT, SUR DES BACTÉRIES EMPOISONNÉES DE FAÇON RÉVERSIBLE PAR LE CYANURE DE POTASSIUM.

Dans toutes sortes d'expériences, il est désirable de pouvoir :
1° réaliser l'adsorption de bactériophages sur des bactéries, sans que commence le développement du phage chez les bactéries

infectées les premières ; 2° déclencher, au moment choisi, le développement du phage chez toutes les bactéries.

Ces conditions ont été réalisées en infectant des bactéries lavées, suspendues en tampon et carencées : le développement du phage ne commence que lors d'une addition ultérieure de milieu nutritif. Toutefois, cette méthode est lente et présente des inconvénients tels que ralentissement de la vitesse d'adsorption, infections abortives, etc.

Doermann (1948) a montré que l'addition de KCN à des bactéries infectées arrête le développement du phage. Si le KCN est ajouté avant l'apparition des premiers phages intrabactériens, cette inhibition est levée par simple dilution.

Nous avons utilisé cette technique pour adsorber des phages sur des bactéries préalablement empoisonnées par le KCN, puis déclencher ultérieurement le développement par la dilution de la suspension au moment choisi.

On peut suivre avec précision le développement des complexes *E. coli* B-T2 pendant les premières minutes de la période latente, grâce à l'augmentation progressive de la résistance aux U. V. Si, pour une raison quelconque, le développement est bloqué à un certain stade, la résistance ne varie plus et sa valeur indique le stade d'arrêt.

Dans l'expérience représentée par la figure 1, on a ajouté du KCN (M/100 final) à une culture en bouillon à 37° d'*E. coli* B contenant environ 4.10^8 bactéries/ml. Trois minutes plus tard (temps 0), on ajoute une suspension de phage T2 de manière à obtenir une multiplicité d'environ 0,05. La suspension est maintenue à 37°. A des temps variables, on prélève un échantillon que l'on dilue en tampon glacé. Chacune de ces suspensions est irradiée avec une dose unique qui, pour le phage libre, laisse 10 p. 100 de survivants.

A $t =$ trente minutes, un échantillon de la suspension cyanurée est dilué mille fois dans du bouillon et agité à 37°. Toutes les deux minutes, un échantillon est dilué dans du tampon glacé et irradié avec la même dose d'U. V. que précédemment.

Cette expérience a montré que :

1° l'adsorption du phage en cinq minutes sur les bactéries cyanurées est la même que sur les bactéries témoins ;

2° il n'y a pas de pertes de centres infectieux pendant une heure ;

3° en présence de cyanure, la résistance des complexes aux U. V. reste constante pendant les quarante-cinq minutes de l'expérience (courbe 1), ce qui prouve que le développement du phage est complètement arrêté dans ces conditions ;

4° immédiatement après dilution à la trentième minute, le

développement du phage commence, comme le montre l'accroissement de la résistance des complexes aux U. V. (courbe II). De plus, la vitesse de l'augmentation de la résistance est analogue à celle que l'on observe avec les bactéries témoins non exposées au cyanure.

Chez *E. coli* C infecté par le phage λ , les faibles changements

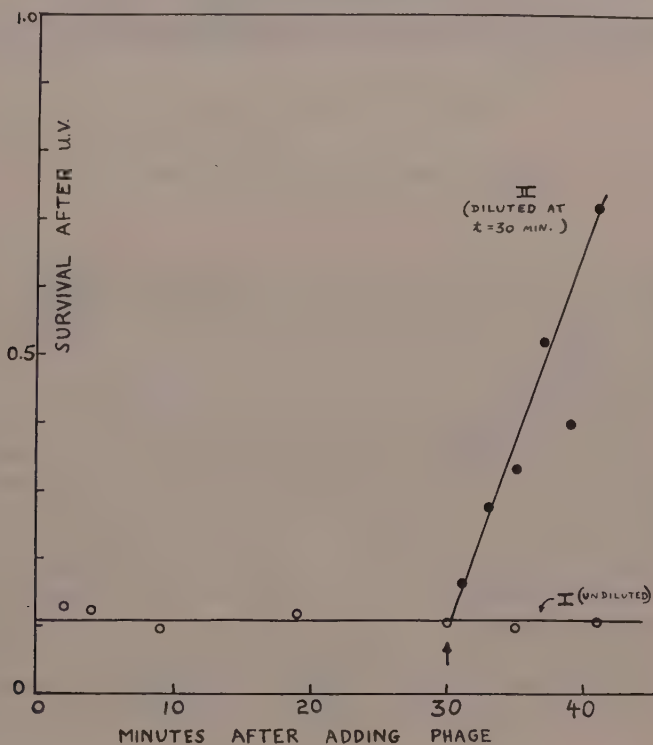


FIG. 1. — Effets du cyanure et de la dilution sur la résistance aux U. V. des complexes *E. coli* B-T2 formés en présence de cyanure. Aux bactéries en bouillon on ajoute du KCN (M/100 final) et 5 min. plus tard des phages T2. Multiplicité, de l'infection : 5.10^{-2} . Des échantillons prélevés à des temps différents sont irradiés avec une même dose d'U. V. L'ordonnée représente la fraction des complexes survivants. Courbe I, suspension en bouillon + KCN M/100. Courbe II, après dilution de mille fois en bouillon à $t =$ trente minutes. Expérience à 37° .

de la résistance aux U. V. observés au début de la période latente ne permettent pas de mesurer avec précision le degré de développement du phage. Sur ce système, nous avons seulement vérifié qu'un séjour de dix minutes en KCN ne modifie ni la durée de

la période latente (quarante-cinq minutes), ni le rendement moyen en phages.

Il semble donc que cette technique très simple puisse être utile pour de nombreuses expériences.

BIBLIOGRAPHIE

- A. H. DOERMANN. *Carnegie Institution of Washington Yearbook*, 1948, 47, 176-186.

ACTIONS DES ULTRA-VIOLETS LONGS ET DES VISIBLES COURTS (3400-5500 Å) SUR LES COMPLEXES BACTÉRIE-BACTÉRIOPHAGE

par R. LATARJET et B. MILÉTIC

(Institut Pasteur. Service de Radiobiologie, Paris.)

La photorestauration (P. R.) de bactéries ou de complexes bactérie-phage, préalablement irradiés avec des rayons ultra-violet, est produite par les radiations 3 500-5 000 Å situées de part et d'autre de l'extrémité inférieure du spectre visible (Dulbecco 1949, Kelner 1951). La lampe à vapeur de mercure à haute pression émet ces radiations avec une très grande intensité, et semble constituer de ce fait la source actuelle la plus propice aux expériences de P. R., à condition que l'on élimine l'U. V. moyen par une enveloppe de verre. En utilisant cette source dans des expériences de P. R., soit sur des complexes (B-T2, K.12-T2), soit sur des bactéries lysogènes, nous avons observé des résultats inattendus. Au lieu de réparer les lésions produites par une irradiation U. V. préalable (2 537 Å), on les accentuait parfois, tant en ce qui concerne la survie des bactéries que leur capacité à produire du phage. La présente étude se rapporte à l'action directe de ces radiations de grandes longueurs d'onde.

MATÉRIEL.

La source utilisée était un brûleur Philips S. P.-500 de 500 watts, à enveloppe de verre, refroidi par une circulation d'eau. Le tableau I fournit la distribution de l'énergie dans son rayonnement.

L'énergie totale transportée par les radiations de l'intervalle spectral 3 300-5 000 Å était égale à

1 milliwatt par cm² à 1 m. de la source.

Nous avons administré en général des doses de 0,15 à

0,75 joules mm^{-2} correspondant, selon les cas, à des expositions de une à dix minutes à des distances de 5 à 20 cm.

Par ailleurs, dans les expériences exigeant une irradiation U. V. préalable, nous avons utilisé une lampe à vapeur de mercure à basse pression donnant presque exclusivement la radiation 2 537 Å. Pour éviter toute confusion, nous désignerons dans ce qui suit, par « irradiation » le traitement par λ 2 537, et par « illumination » le traitement par les radiations de grandes longueurs d'onde.

Les germes utilisés furent les deux souches B (non lysogène) et K. 12 (lysogène) de *Escherichia coli*, et le phage T2 actif sur ces deux souches.

I. — ILLUMINATION DES BACTÉRIES B.

Des bactéries B ont été illuminées, puis examinées quant à leurs aptitudes à former des colonies, à adsorber le phage T2 et à assurer la croissance de ce dernier.

a) *Pas d'effet léthal.* — Hollaender (1943) a montré que les U. V. de grandes longueurs d'onde exercent un très faible effet léthal sur *E. coli*. Dulbecco et Weigle (1952), utilisant une lampe de même type que la nôtre, ont montré que la courbe de survie de *E. coli*, illuminé par le rayonnement total, est du type à coups multiples, avec un long plateau correspondant à une exposition d'une heure (la dose absolue n'était pas donnée).

Les doses de 0,1 à 0,5 J.mm^{-2} que nous avons utilisées se situent sur ce plateau et ne produisent aucun effet léthal notable. Des bactéries illuminées sur gélose-bouillon donnent, après incubation, autant de colonies que les témoins.

Exemple d'une expérience :

Témoins non illuminés	{ 584 colonies. 375 —
Illuminées 0,15 J.mm^{-2}	{ 576 — 500 —

Même résultat négatif si on met les bactéries pendant quinze minutes au contact de bouillon illuminé (0,15 J.). Après étalement sur gélose et incubation, on trouve des colonies en nombres comparables.

Exemple d'une expérience :

Témoins	{ 485 colonies. 176 —
Traités	{ 456 — 174 —

On obtient les mêmes résultats négatifs avec *E. coli* K. 12.

b) *Pas d'effet sur l'adsorption du phage T2.* — Le même taux d'adsorption du phage T2 est observé chez les bactéries B illuminées aux doses précédentes et chez les bactéries témoins.

c) *Pas d'effet sur la croissance du phage T2.* — Le phage T2 mis au contact des bactéries précédemment illuminées, puis incubées dans du bouillon à 37°, s'y développe comme chez les témoins, avec la même période latente (vingt et une à trente-cinq minutes) et le même rendement moyen (180 particules T2 par bactérie).

Ainsi l'illumination de la bactérie B, avec des doses modérées, ne modifie pas son aptitude à se diviser, ni sa capacité à adsorber le phage T2, puis à assurer la croissance de ce dernier.

II. — ILLUMINATION DU PHAGE T2.

Si on illumine le phage T2 déposé sur gélose-bouillon, ou dispersé dans du bouillon, et si, aussitôt après, on le soustrait au milieu illuminé, on obtient un certain degré d'inactivation directe correspondant au phénomène décrit par Wahl et Latarjet (1947). Par exemple, une dose de $0,30 \text{ J.mm}^{-2}$ laisse en moyenne 40 survivants pour 100.

Le bouillon (comme la gélose) illuminé présente une grande toxicité vis-à-vis du phage qu'on y introduit subséquemment. Cette toxicité est supprimée par l'addition de catalase, *avant*, ou *après* l'illumination. Voici, par exemple, les nombres de plages observées au cours de 3 expériences où du phage séjournait pendant vingt minutes dans du bouillon préalablement illuminé ($0,75 \text{ J.mm}^{-2}$).

NOMBRE DE PLAGES :		
Témoin	Traité	
	sans catalase	avec catalase
1 450	600	1 458
800	0	870
1 200	0	1 307

Ainsi, l'illumination d'un milieu organique comme le bouillon ou la gélose, produit des substances assez stables, toxiques pour le phage T2 libre. Cette toxicité est supprimée par la catalase. Elle ne s'exerce pas sur la bactérie B (paragraphe I).

III. — ILLUMINATION DES COMPLEXES B-T2.

a) *Effet léthal.* — Une culture de bactéries B en croissance dans le milieu synthétique M9 à 37°, et contenant 5.10^7 cellules par centimètre cube, est infectée avec 10^6 T2 par centimètre cube. Après six minutes d'incubation à 37°, on dilue 1/200 en tampon, puis on ensemence 0,1 cm³ sur des boîtes de gélose-bouillon et de gélose synthétique M9, en présence d'un excès de bactéries B destinées à servir d'indicatrices des complexes B-T2 produisant du phage actif. Ces boîtes sont alors illuminées, puis mises à 37°. Après incubation, on dénombre les plages, et, par comparaison avec les témoins non illuminés, on détermine le taux de « survie » des complexes, c'est-à-dire le taux des bactéries infectées chez qui l'illumination n'a pas supprimé la production de phage actif.

Avec une dose de 0,15 J.mm⁻², on a trouvé comme valeurs moyennes de la survie :

Sur gélose-bouillon	0,67 p. 100
Sur gélose-M9	4,60 p. 100

L'action léthale est moins accentuée sur le milieu synthétique plus pauvre en substances organiques.

L'illumination peut être pratiquée en milieu liquide. Après quoi, les complexes sont étalés sur gélose-bouillon avec un excès de bactéries sensibles. Dans les conditions précédentes (0,15 J. administrés à la sixième minute du développement intracellulaire du phage), on a trouvé comme valeurs moyennes de la survie :

En bouillon	1 p. 100
En M9	98 p. 100

L'action léthale est donc très nette en milieu organique, et nulle en milieu synthétique M9 où le glucose constitue le seul élément carboné.

b) *Variation de la sensibilité pendant la période latente.* — On sait que la sensibilité aux rayons X et U. V. des complexes en voie de développement varie au cours de la période latente et reflète les principales étapes du développement intracellulaire du phage (Luria et Latarjet 1947 ; Latarjet 1948 ; Benzer 1952). En vue de vérifier s'il en est de même ici, on infecte, à l'instant zéro, 10^8 B en voie de croissance avec 10^6 T2. Après adsorption, on dilue deux cents fois en bouillon à 37°. A l'instant t , on prélève 3 cm³ de la suspension que l'on illumine (0,15 J.mm⁻² délivrés en deux minutes). Puis on ensemence 0,1 cm³ sur gélose-bouillon avec un excès de bactéries B. On répète cette opération

à divers instants t , de manière à explorer la période latente longue de vingt et une minutes. Voici les résultats d'une expérience :

INSTANT de l'illumination	SURVIE (p. 100)
3 minutes	2,7
5 —	2,8
7 —	1,2
9 —	2,2
11 —	11
13 —	17
15 —	37
17 —	73

Il résulte de l'ensemble des expériences que la sensibilité, à peu près constante pendant les six premières minutes, présente un maximum à la septième, puis diminue rapidement. A la fin de la période latente, les complexes deviennent très résistants.

c) *Période latente des complexes survivants.* — Une expérience de croissance en cycle unique, pratiquée sur les survivants de l'expérience précédente, montre un allongement de la période latente d'autant plus importante que l'illumination est pratiquée plus précocement. A la cinquième minute, la période latente est portée à environ quatre heures ; à la treizième minute, elle est portée à environ deux heures trente.

Les rendements individuels n'ont pas été déterminés.

d) *Radiations efficaces.* — Des expériences grossières effec-

TABLEAU I. — Distribution de l'énergie dans le rayonnement d'une lampe Philips S. P. - 500 (Latajet et Berger).

λ	Intensités relatives	
	raies	fond continu
3130	0) ... 11
3342	4,6	
3650	27) ... 21
4047	27	
4358	53) ... 48
5461	100	
5780	85) ... 54
etc	

tuées avec divers filtres sélectifs ont montré que, dans l'effet du rayonnement total de la source utilisée (tableau I), les rayons U.V. ($\lambda < 3\ 800$) interviennent pour 3 parts et les rayons visibles pour 1 part.

e) *Influence de la catalase.* — L'action léthale de l'illumination sur les complexes B-T2 en milieu organique est quasi annulée par la présence de la catalase. Dans l'expérience suivante, des mono-complexes sont étalés sur gélose avec et sans catalase (2 γ de catalase cristallisée par boîte). Les boîtes sont illuminées à la sixième minute du développement intracellulaire des phages, avec une dose de 0,15 J.mm⁻². Après incubation, on dénombre les plages :

	NOMBRE DE PLAGES SUR	
	gélrose-bouillon	gélrose-M9
Témoin (non illuminé)	700	700
Illuminé sans catalase	29	40
Illuminé avec catalase	605	674

Si, dans cette expérience, on ajoute la catalase *après* l'illumination, aucune restauration ne se manifeste.

IV. — CONSÉQUENCES SUR LES EXPÉRIENCES DE PHOTO-RESTAURATION.

Les faits précédemment décrits permettent d'interpréter les anomalies observées au cours des expériences de P. R. qui furent à l'origine de ce travail.

Rappelons que dans ces expériences une population de bactéries ou de complexes est d'abord irradiée avec $\lambda\ 2\ 537$. En conséquence de cette irradiation les individus constituant la population sont inactivés, c'est-à-dire qu'ils perdent leur capacité, soit à former des colonies, soit à former du phage actif, selon le genre d'essais auxquels on procède. On illumine ensuite cette population dans le but de restaurer cette capacité chez un certain nombre des individus inactivés (P. R.). Nous envisagerons successivement les 4 cas suivants :

- a) Bactérie non lysogène (B) ;
- b) Complexe d'une bactérie non lysogène (B-T2) ;
- c) Bactérie lysogène (K. 12) ;
- d) Complexe d'une bactérie lysogène (K. 12-T2).

a) *Bactérie non lysogène (B).* — L'illumination étant sans effet léthal sur les bactéries B (paragraphe I), l'expérience se déroule conformément aux expériences habituelles de P. R. En tous milieux, organiques ou non, l'illumination restaure une frac-

tion importante des cellules inactivées par l'irradiation U. V. (tableau II).

TABLEAU II. — **Illumination d'une bactérie non lysogène (B) irradiée**
(capacité de former des colonies).

B en tampon 4×10^6 par cm^3		
Irradiation UV : $1750 \text{ ergs mm}^{-2}$		
.05 cm^3 étalé sur gélose		
Illumination : $0,15 \text{ J. mm}^{-2}$		
Incubation et numération des colonies		
Témoin (non illuminé)	30 29	} survie $1,5 \times 10^{-4}$
Illuminé sur gélose-bouillon	2508 1284	
Illuminé sur gélose synthétique ...	2932	} restauration
	1486	

b) *Complexe d'une bactérie non lysogène (B-T2)*. — D'après les résultats du paragraphe III, l'illumination produit, chez les complexes B-12, un effet léthal accusé dans un milieu organique tel que le bouillon, et nul en milieu minéral. On peut donc prévoir que les résultats d'une expérience de P. R. dépendent du milieu dans lequel on opère. Le tableau III fournit un exemple d'une telle expérience.

Si l'illumination a lieu dans un tampon minéral, la P. R. se manifeste (moins importante que lorsqu'on photoréactive du phage adsorbé par des bactéries non irradiées ; ici l'hôte est fortement endommagé par les U. V.). Sur milieu organique (gélose-bouillon), un effet léthal important se manifeste, qui masque complètement la P. R. et simule un phénomène inverse de la restauration attendue. Sur un milieu moins riche en substances organiques (gélose synthétique), on obtient un résultat intermédiaire, la lumière semblant sans action. Il est probable que, sur ce milieu, la P. R. (révélée par l'essai en milieu minéral) parvient à compenser une action léthale moins importante que sur gélose-bouillon.

TABLEAU III. — Illumination de complexes B-T2 irradiés
(capacité de former du phage actif).

7 X 10⁷ monocomplexes mis en suspension dans un tampon,
5 minutes après l'infection.

Irradiation UV : 1800 ergs mm⁻²

Illumination : 0,15 J.mm⁻²

Incubation de 0,05 cm³ sur gélose avec un excès de B,
puis numération des plages.

Témoin (non illuminé)	170 110	} survie 4,5x10 ⁻⁵
Illuminé sur gélose-bouillon	8 12	} effet léthal
Illuminé sur gélose synthétique ..	168 172	}
Illuminé en tampon, puis étalé :		
sur gélose-bouillon.....	854 886	} restauration
sur gélose synthétique..	1258 1242	

c) *Bactérie lysogène* (K. 12). — Une population de bactéries lysogènes (K. 12) placées dans des conditions métaboliques appropriées, subit, sous l'action des rayons U. V., le phénomène « d'induction » (Lwoff et al. 1950). Chez certaines bactéries « induites » (dont le nombre dépend de la dose d'U. V. et du milieu de croissance) l'irradiation induit la synthèse du virus (λ) transporté par la souche. De ce fait, les cellules deviennent des complexes K. 12- λ qui, au bout d'un certain temps, lysent et libèrent les virus nouvellement formés. Chez les autres bactéries « non induites », la synthèse du virus ne se manifeste pas ; ces cellules semblent se comporter comme n'importe quelle bactérie non lysogène, les unes restant stérilisées par l'irradiation, les autres survivant en continuant de se diviser.

L'irradiation U. V. réalise ainsi un mélange de bactéries K. 12,

stérilisées ou non, et de complexes K. 12- λ , dont la P. R. revêt donc un double aspect :

1° A l'égard des complexes : annulation de la synthèse du virus, c'est-à-dire de l'induction (Jacob 1950), problème que nous n'étudierons pas ici :

2° A l'égard des cellules non induites : rétablissement de la capacité de division chez les cellules stérilisées.

Considérons ce second aspect. On a vu au paragraphe I qu'aux doses ici utilisées l'illumination est sans effet sur K. 12 comme sur B. On peut donc penser que les cellules K. 12 irradiées et non induites réagissent à l'illumination de la même manière que les cellules B irradiées, non lysogènes et non infectées, par une P. R. sur tous les milieux (tableau II). Contrairement à cette attente, elles réagissent en réalité comme les complexes B-T2.

Les résultats du tableau IV sont en effet superposables à ceux du tableau III, à savoir : par de P. R. apparente ; effet léthal important sur gélose-bouillon ; absence apparente d'effet sur gélose synthétique, probablement par compensation entre P. R. et effet léthal réduit.

TABLEAU IV. — **Illumination d'une bactérie lysogène (K. 12) apte à l'induction, irradiée (capacité de former des colonies).**

K.12 en tampon 4×10^6 par cm^3	
Irradiation UV : $1800 \text{ ergs mm}^{-2}$	
0,1 cm^3 étalé sur gélose	
Illumination : $0,15 \text{ J.mm}^{-2}$	
Incubation et numération des colonies	
Témoin (non illuminé)	
gélose-bouillon	408)
	432)
gélose synthétique	528)
	604)
survie $1-10^{-3}$	
Illumination sur gélose-bouillon ...	
	11)
	12)
effet léthal	
Illumination sur gélose synthétique.	
	405)
	427)

Puisque ces bactéries, considérées comme non induites, réagissent à l'illumination de la même manière que des bactéries infectées, on peut penser que, sous l'action des U. V., elles subissent une sorte d'« induction abortive » :

Insuffisante pour conduire jusqu'à la synthèse de virus actifs, et pour supprimer la division cellulaire ;

Suffisante pour mettre ces cellules dans une situation à certains égards analogue à celle où se trouve une bactérie récemment infectée par un phage, situation qui établit cette sensibilité particulière des complexes à l'illumination sur milieu organique.

Mais on peut envisager d'autres interprétations dont la discussion demande d'autres faits expérimentaux.

Il est intéressant de constater que si l'on répète l'expérience précédente sur des bactéries K. 12 préparées dans des conditions qui les rendent inaptes à l'induction, le phénomène précédent ne se reproduit pas (tableau V).

TABLEAU V. — Illumination d'une bactérie lysogène (K. 12) non apte à l'induction, irradiée (capacité de former des colonies).

K.12 en tampon 4×10^6 par cm^3		
Irradiation UV : $1600 \text{ ergs mm}^{-2}$		
0,1 cm^3 étalé sur gélose		
Illumination : $0,15 \text{ J. mm}^{-2}$		
Incubation et numération des colonies		
Témoin (non illuminé).....	516 424	} survie 1×10^{-3}
Illumination sur gélose-bouillon....	4250 5620	
		} restauration
Illumination sur gélose-synthétique.	12100 13380	} restauration

L'illumination sur milieu organique perd sa toxicité ; la P. R. se produit dans tous les cas ; K. 12 inapte se comporte ici comme une bactérie non lysogène ; le tableau V est superposable au tableau II.

d) *Complexe d'une bactérie lysogène (K. 12-T2).* — Weigle et Delbrück (1951) ont montré que le phage lytique T5 se développe

normalement dans des bactéries K. 12 préalablement induites par irradiation U. V., à condition que l'infection soit faite avant l'apparition du phage λ mûr dans les cellules induites. *A fortiori*, si l'infection est pratiquée avant l'irradiation U. V., la croissance du phage lytique ne peut être modifiée par une induction ultérieure.

Dans ces conditions, on peut prévoir que les complexes K. 12-T2 se comportent, vis-à-vis d'une irradiation U. V. et d'une illumination subséquente, de la même manière que les complexes B-T2. C'est ce que montre l'expérience (tableau VI). Les résultats du tableau VI se superposent à ceux du tableau III ; P. R. en milieu minéral, action toxique en milieu organique.

TABLEAU VI. — Illumination de complexes K. 12-T2 irradiés (capacité de former du phage actif).

7 X 10 ⁵ monocomplexes mis en suspension dans un tampon		
5 minutes après l'infection		
Irradiation UV : 1800 ergs mm ⁻²		
Illumination : 0,15 J.mm ⁻²		
Incubation de 0,05 cm ³ sur gélose avec un excès de B, puis numération des plages.		
Témoin (non illuminé)	511 446	} survie 1,4x10 ⁻³
Illuminé sur gélose-bouillon	12 48	
Illuminé sur gélose synthétique	496 441	} effet léthal
Illuminé en tampon, puis étalé :		
sur gélose-bouillon	2724 2508	} restauration
sur gélose synthétique	2510 2430	

V. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Il a été démontré (Wyss et al. 1948) que les rayons U. V. de courte longueur d'onde (2 537 Å) produisent dans le bouillon des substances stables douées d'activités létale et mutagène sur les

bactéries. Comme ces actions sont inhibées par la catalase, on est tenté d'identifier ces substances à des peroxydes organiques dont on a pu démontrer par ailleurs les pouvoirs toxique et mutagène (Dickey et al. 1949).

Le présent travail démontre que les radiations de plus grandes longueurs d'onde (3 400-5 500 Å), efficaces dans le phénomène de photo-restauration, produisent également dans le bouillon et, à un degré moindre, dans la gélose, des substances actives dont les effets sont inhibés par la catalase. Aux doses de lumière utilisées, ces substances sont pratiquement sans action sur les bactéries *E. coli* B et K. 12, mais présentent une toxicité importante sur le phage T2 nu. Les complexes formés par ce phage et les bactéries précédentes sont inactivés par l'illumination en milieu organique, avec une sensibilité maximum au cours des premières étapes du développement intracellulaire du phage.

Ces constatations entraînent des conséquences concernant les expériences de photo-restauration après irradiation U. V., et expliquent les faits suivants :

1° La P. R. de *E. coli* B non lysogène irradié se manifeste dans tous les milieux.

2° La P. R. des complexes B-T2 et K. 12-T2 se manifeste seulement en milieu minéral. En milieu organique, elle est masquée par l'action léthale de l'illumination, laquelle entraîne l'effet inverse de la restauration attendue.

3° La bactérie K. 12 irradiée, puis étudiée quant à sa capacité de se diviser, réagit à l'illumination :

De la même manière que les complexes lorsqu'elle est apte à l'induction, c'est-à-dire par une P. R. en milieu minéral et un effet léthal en milieu organique ;

De la même manière que la bactérie non lysogène B lorsqu'elle est inapte, c'est-à-dire par une P. R. dans tous les milieux.

BIBLIOGRAPHIE

- S. BENZER. *J. Bact.*, 1952, **63**, 59.
F. H. DICKEY, G. H. CLELAND et C. LOTZ. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1949, **35**, 581.
R. DULBECCO. *Nature*, 1949, **163**, 949.
R. DULBECCO et J. J. WEIGLE. *Experientia*, 1952, **8**, 386.
A. HOLLAENDER. *J. Bact.*, 1943, **46**, 531.
F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **231**, 1885.
A. KELNER. *J. gen. Physiol.*, 1951, **34**, 835.
R. LATARJET. *J. gen. Physiol.*, 1948, **31**, 529.
R. LATARJET et L. R. CALDAS. *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 455.

- S. E. LURIA et R. LATARJET. *J. Bact.*, 1947, **53**, 149.
A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 815.
R. WAHL et R. LATARJET. *Ces Annales*, 1947, **73**, 957.
J. J. WEIGLE et M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
O. WYSS, J. B. CLARK, F. HAAS, W. S. STONE. *J. Bact.*, 1948, **56**, 81.

**KINETIC STUDIES ON THE MECHANISM
OF PHOTOREACTIVATION
OF BACTERIOPHAGE T2 INACTIVATED
BY ULTRAVIOLET LIGHT (1)**

by GEORGE BOWEN (2).

[Kerckhoff Laboratories of Biology, California Institute
of Technology, Pasadena, California] (3).

Bacteriophage particles are called active if they are capable of generating a plaque when plated on nutrient agar together with sensitive bacteria. Exposure of the particles to ultraviolet radiation of wave length 253.7 m μ inactivates them in this sense. Following adsorption of the inactive particles to sensitive host bacteria, exposure of the suspension to light of the violet and near ultraviolet region causes a fraction of the particles to regain their activity, a phenomenon called photoreactivation.

The kinetics of photoreactivation of bacteriophage T2 have been investigated for the purpose of studying the mechanism by which photoreactivation takes place. The presence of both a light and a dark reaction step have been demonstrated, and both have been shown to follow first-order kinetics. The amount of reactivation produced by a given light treatment is determined by the interaction of the light and dark reactions. This interaction can be described satisfactorily in terms of a simple model for the reaction mechanism. It appears that the dark reaction precedes the other and has the function of supplying the light-absorbing material which enters into the light reaction.

The experimental work has made use of bacteriophage type T2r and *Escherichia coli*, strain B. The bacteria are grown in tryptone broth at 37° C, with aeration, to a concentration of

(1) Abstract of thesis presented in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy at the California Institute of Technology, Pasadena, California, 1953.

(2) Predoctoral Research Fellow of the National Foundation for Infantile Paralysis.

(3) Present address : Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee.

about 2×10^8 cells per ml, then washed and resuspended in a buffered saline solution (Na_2HPO_4 , 7.0 g; KH_2PO_4 , 3.0 g; NaCl , 4.0 g; MgSO_4 , 0.2 g; H_2O , 1 000 ml). The phage particles, suspended in buffer, are exposed to light from a germicidal lamp (a low-pressure mercury-discharge lamp) for sufficient time to reduce survival to about $1 - 5 \times 10^{-3}$. The particles are then added to the washed bacterial cells and adsorption allowed to go to completion at 37°C in the buffer. The average multiplicity of infection is about 10^{-3} , so that all results are for single infection. Small samples taken from the adsorption mixture are exposed to various types of light treatment and later assayed for infective centers to determine the amount of photo-reactivation produced. The preparations are quite stable both before and after light exposure. The light source is a 1000-watt projection lamp; the light is filtered through a copper sulfate solution, then focused on the sample. Control of the exposure time is accomplished by means of a shutter in the light path. The temperature of the sample is accurately regulated. The following experimental results have been found:

1° At the beginning of a period of continuous exposure to light, the rate of reactivation is directly proportional to the light intensity and changes only slightly with the temperature. At high light intensities, however, the rate decreases rapidly, as an exponential function of time, to a lower value which thereafter remains constant. The rate of decay of the reactivation rate is approximately proportional to the light intensity and is almost independent of the temperature. A representative value for the time constant of this decrease in rate is about 0.9 second at the highest intensity that has been available in the apparatus.

2° Following the transient initial period a steady state condition exists in which the rate of reactivation, R , can be expressed as a function of the light intensity, I , as.

$$R = R_{\max} \left(\frac{I}{I + B} \right),$$

where R_{\max} and B are appropriate constants. R_{\max} is thus the maximum, or limiting rate which is approached at very high light intensities, and B is the intensity at which half the maximum rate is reached. Both change rapidly with the temperature and have been measured in the range $0 - 45^\circ \text{C}$. The measurements give relative values only, but these serve to show the temperature dependence of the quantities.

3° During further continuous illumination the number of active infective centers increases with time approximately as the function $(1 - e^{-at})$, where a is a constant.

4° If a long dark interval is allowed to follow a flash of intense light, a second identical flash produces the same high initial rate and the same total amount of photoreactivation as the first, indicating a return of the system to the initial state during the dark interval. If different samples are subjected to series of flashes which are identical except in the length of the dark intervals separating the flashes, the amount of photoreactivation obtained in each case depends on the length of the dark intervals, and its increase can be taken as a measure of the progress of the dark reaction. The increment is described by the function $(1 - e^{-Ct_d})$, where t_d is the dark interval length. The constant C is thus the rate constant of the dark reaction. It changes with temperature and has been measured in the range 0-45° C; representative values of the time constant, $(1/C)$, are about 35 seconds at 37° C and about 9 minutes at 0° C.

5° If the temperature is changed immediately after a light flash, the amount of reactivation obtained is unaltered. If the temperature is changed before the light flash, however, time is required for dark reactions to reach equilibrium, and the yield of reactivation from the flash depends on its timing relative to the temperature change. The time required for establishment of equilibrium following a temperature change appears to be the same as that required for the recovery from the effects of a previous light flash when both are measured at the same temperature, indicating that the same dark reaction is involved in both.

6° Experiments on the relation of photoreactivation to adsorption show that no reactivation is produced by exposure to light of either the bacteria or the free phage particles before they are mixed, but that at high bacterial concentrations the ability to be reactivated develops without observable lag from the time of mixing. Samples have been exposed to a single short (5-second) flash of high-intensity light at various times after the mixing, and the amount of photoreactivation produced has been determined as a function of the time. It increases approximately exponentially, with a time constant of about 1 3/4 minutes at 37° C, reaches a maximum in about 8 minutes, and remains constant thereafter. The rate-limiting step in this process is not the first attachment of the particles to the bacteria, since this step has been shown by experiment to be complete within 30 seconds under the given conditions.

These results have been interpreted in the following way. Initially only the light reaction step is rate determining. The rate of reactivation is directly proportional to the light reaction rate, hence to the light intensity; this rate is little affected by

temperature. The action of the light reduces the available amount of light-absorbing material, leading to a rapid decrease in reactivation rate at high intensities.

After the transient initial period a steady-state condition is reached in which the amount of light-absorbing material present is determined by the interaction of the light and dark reaction steps. The maximum steady-state rate of reactivation, R_{\max} , is fixed by the rate of the dark reaction, and this is highly temperature dependent. The light intensity necessary to produce a given degree of saturation is also determined by the dark reaction and is temperature dependent.

In the dark following exposure to intense light the dark reaction continues and restores the initial conditions. The experiments show that this reaction follows first-order kinetics. Since only temperature changes before a light flash affect the yield of reactivation from that flash, it must be assumed that the function of the dark reaction is the production of material for later use by the light reaction, rather than the utilization of active material already produced by the light.

A formal model for the reaction mechanism has been set up, and its behavior has been analysed and compared with the experimental results. The model supposes a single reversible dark reaction step followed by an irreversible light reaction step acting on the product of the dark reaction. The probability that photoreactivation occurs in the cell is assumed to be proportional to the time integral of the rate of the light reaction step. The agreement between experiment and predictions based on the model is very good.

Although it would not be justified to assume that this model necessarily corresponds exactly to the actual mechanism of photoreactivation, it seems likely that the model is at least closely related to it. The present results suggest the sort of chemical mechanism which must be looked for in photoreactivation, and provide extensive data for its identification when it is found.

DÉFINITION DE QUELQUES TERMES RELATIFS A LA LYSOGÉNIE

par F. JACOB, A. LWOFF, A. SIMINOVITCH et E. WOLLMAN.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie microbienne.)

« Le mot doit faire naître l'idée, l'idée doit peindre le fait ; et comme ce sont les mots qui conservent les idées et qui les transmettent, il en résulte qu'on ne peut perfectionner le langage sans perfectionner la science, ni la science sans le langage, et que quelque certains que fussent les faits, quelque justes que fussent les idées qu'ils auraient fait naître, ils ne transmettraient encore que des impressions fausses, si nous n'avions pas des expressions exactes pour les rendre. »

Antoine-Laurent LAVOISIER.

*Discours préliminaire
du traité élémentaire de chimie (1789).*

Depuis 1950, nombre de données relatives à la lysogénie ont été précisées et des conceptions nouvelles ont pris naissance. Il a semblé qu'un glossaire donnant la définition de termes anciens et récents pourrait être de quelque utilité.

Aptitude. — Condition physiologique permettant aux bactéries lysogènes de réagir à l'action des agents inducteurs par le développement du prophage. Contraire : inaptitude.

Bactérie bactériocinogène. — Bactérie qui perpétue héréditairement le pouvoir de produire une bactériocine (voir ce mot). Cas particulier : *bactérie colicinogène*, *bactérie pyocinogène*.

Bactérie lysogène. — Bactérie qui perpétue héréditairement le pouvoir de produire des bactériophages. La nature du prophage perpétué est exprimée par le symbole du phage entre parenthèses. Ex. : *E. coli* (λ).

Bactérie non réceptive. — Bactérie incapable d'adsorber un phage.

Bactérie réceptive. — Bactérie capable d'adsorber un phage donné. L'infection peut être *abortive*, *productive* ou *réductive* (voir à *infection* la définition de ces termes).

Bactérie résistante (vis-à-vis d'un phage donné). — Bactérie

qui n'est pas tuée par ce phage, soit qu'elle ne l'adsorbe pas (faute, par exemple, de récepteurs), soit qu'elle l'adsorbe et le neutralise, soit qu'elle devienne lysogène. Terme très général, couvrant des situations variées. Devrait être réservé au cas où le facteur responsable de la survie microbienne n'a pas été défini.

Bactérie sensible. — Bactérie réceptive qui est tuée par le phage qu'elle adsorbe, et qui reproduit ce phage.

Bactériocines. — Terme groupant les protéines du type colicine, dont la biosynthèse est létale, et dont l'adsorption est conditionnée par la présence d'un récepteur spécifique. Exemples : *colicine*, *pyocine*.

Immunité. — Etat conféré à une bactérie lysogène par la présence du prophage et qui lui permet de survivre à une infection bactériophagique. Une bactérie lysogène est toujours immune vis-à-vis du phage correspondant au prophage qu'elle perpétue.

Induction (d'un prophage). — Déclenchement provoqué du développement du prophage en phage.

Infection abortive. — Infection suivie de la disparition du complexe en tant que centre infectieux. La bactérie peut ou non survivre à une infection abortive.

Infection productive. — Infection suivie de la production de nouveaux phages.

Infection réductive. — Infection suivie de la transformation du phage en prophage (voir *réduction*). Une infection réductive correspond à une lysogénisation.

Lysogénisation. — Action de conférer la lysogénie à une bactérie non lysogène.

Phage tempéré. — Phage capable de donner des systèmes lysogènes.

Phage virulent. — Phage incapable de donner des systèmes lysogènes.

Prophage (ou probactériophage). — Forme sous laquelle les bactéries lysogènes perpétuent le pouvoir de produire des bactériophages.

Réduction (du phage). — Conversion du phage en prophage. (Terme proposé par Max Delbrück).

REMARQUES.

Les expressions : *phages symbiotiques* et *phages lysogènes* désignent tantôt les phages produits par les bactéries lysogènes, c'est-à-dire les phages tempérés, tantôt le prophage. Rappelons qu'une bactérie lysogène ne transporte pas de phages, mais perpétue un prophage.

L'expression : *phage lytique* ne semble pas très heureuse. En

effet, le développement d'un phage entraîne toujours la mort et la lyse de la bactérie. Ceci est vrai non seulement pour le développement du phage virulent, mais aussi pour le développement du phage tempéré, qu'il ait lieu à partir d'un prophage ou à partir d'un phage infectant.

L'expression : *culture pseudo-lysogène* (synonyme : « phage carrying strain »), désigne une culture dans laquelle une population mixte de bactéries et de bactériophages se maintient en équilibre plus ou moins stable. Les bactéries ne sont pas lyso-gènes. On peut les débarrasser des phages par divers procédés : étalement, sérums antiphage.

L'INDUCTION

par A. LWOFF (*)

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

LE PROPHAGE.

Les bactéries lysogènes perpétuent héréditairement le pouvoir de produire des bactériophages. La majorité des germes d'une population lysogène ne contient ni ne libère de phages. Ceux-ci n'apparaissent que dans un nombre restreint de bactéries et l'on admet que le développement des bactériophages se produit à partir d'une particule spécifique, d'un prophage. Ce développement peut, dans certains cas, être induit par divers agents. Avant d'aborder l'étude de l'induction il convient de dire quelques mots de la notion du prophage.

C'est J. Bordet [1] qui, en 1925, eut semble-t-il le premier, une notion claire de la lysogénie. Après avoir constaté que dans une souche lysogène toutes les bactéries donnent naissance à des clones lysogènes, J. Bordet avait compris que le bactériophage des bactéries lysogènes est « inscrit dans la trame héréditaire de la bactérie ». Quelques années plus tard, en 1928, Bordet et Renaux [2] insistaient à nouveau sur le fait que la lysogénie « se lègue invariablement de chaque individu à sa descendance ». Puis, en 1929, Burnet et McKie [3] ayant constaté l'absence de particules infectieuses dans les bactéries lysogènes concluent, eux aussi, que « toutes les bactéries d'une souche lysogène renferment dans leur constitution héréditaire une unité potentiellement capable de libérer des bactériophages », unité qu'ils ont appelée « anlage », c'est-à-dire ébauche. E. et E. Wollman [4] indépendamment de F. Burnet et F. McKie, ont constaté également l'absence de particules infectieuses dans une autre bactérie lysogène et ont donné le nom de « forme intracellulaire du phage » à la structure responsable du maintien de la lysogénie. L'absence de corpuscules infectieux a été confirmée par A. Gratia [5] et plus tard par A. Lwoff et A. Gutmann [6] qui ont créé le terme de *prophage* pour la forme sous laquelle les bactéries lysogènes perpétuent le pouvoir de

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National Cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

produire des bactériophages. La nature du prophage sera discutée à la fin de cette revue.

Parmi les bactéries lysogènes, certaines sont inductibles, d'autres non. Chez les non inductibles, la proportion de bactéries produisant des phages ne peut être modifiée. Le développement du prophage en phage dépend d'un événement spontané rare qui échappe à l'expérimentation et relève pour le moment de l'analyse statistique. Chez les bactéries inductibles, l'expression du caractère potentiel, la production de phages, peut être provoquée à volonté.

Seront successivement envisagés : les agents inducteurs, les conditions de leur efficacité inductrice liées au prophage d'une part, à la bactérie d'autre part, la réversion de l'induction, et le déclenchement de développements abortifs. On discutera enfin le mécanisme de l'action inductrice.

LES AGENTS INDUCTEURS.

Les agents inducteurs, qui déclenchent le développement du prophage en phage, déclenchent aussi la synthèse des bactériocines. Ce sont aussi, on le verra, des agents mutagènes et cancérogènes. Alors cependant que mutations géniques et cancérisation sont des phénomènes rares, l'induction du développement du prophage réussit dans la quasi totalité des germes lysogènes inductibles. Les agents inducteurs peuvent être classés en deux catégories : agents physiques et agents chimiques.

AGENTS PHYSIQUES. — L'induction a été obtenue avec un rayonnement U. V. dont la majorité de l'énergie était représentée par la longueur d'onde 2537 Å (A. Lwoff, L. Siminovitch et N. Kjeldgaard [7]. L'efficacité des rayonnements de diverses longueurs d'onde n'a pas été étudiée. Les rayons K (longueur d'onde moyenne 0,95 Å) sont également inducteurs (R. Latarjet [8]). Il ne semble pas que d'autres types d'irradiation aient été essayés.

AGENTS CHIMIQUES. — Les premiers inducteurs chimiques du développement du prophage chez *B. megatherium* ont été les substances réductrices : acide thiomalique, acide thioglycolique, glutathion réduit, acide L-ascorbique (A. Lwoff et L. Siminovitch [9, 10]. Puis il se révéla que les substances réductrices n'agissent que dans certains types de milieu, dits actifs. La substance des milieux actifs nécessaires à la manifestation de l'action inductrice des réducteurs fut identifiée au cuivre (A. Lwoff [11]). Les ions Cu^{++} seuls, les réducteurs seuls sont

inactifs. Le mélange des deux est inducteur. L'on sait depuis longtemps que le cuivre oxyde de nombreux composés sulfhydrylés avec production d'eau oxygénée (A. Schöberl [12]). L'action inductrice du mélange réducteurs + cuivre pouvait donc être due à la production d'eau oxygénée. Effectivement, 1° la catalase supprime l'effet inducteur du mélange réducteurs + cuivre; 2° l'eau oxygénée elle-même, ajoutée à un milieu organique est inductrice, c'est-à-dire qu'elle déclenche la formation de bactériophages chez *B. megatherium*, aussi bien d'ailleurs que chez *P. pyocyanea*, ainsi que la synthèse de colicine chez *E. coli* ML (A. Lwoff et F. Jacob [13]).

L'eau oxygénée n'est pas inductrice dans les milieux synthétiques. Ces résultats sont en harmonie avec ceux de Wyss et de ses collaborateurs [14, 15] relatifs à l'action mutagène des peroxydes sur les bactéries : l'eau oxygénée ajoutée à un milieu synthétique n'est pas mutagène, alors qu'un mélange d'eau oxygénée et d'acides aminés, d'aldéhyde formique ou d'acétone, est mutagène; certains peroxydes organiques sont mutagènes (Dickey, Cleland et Lotz [16]).

TABLEAU I. — Mutagènes, Cancérigènes et Inducteurs.

	Mutagène	Cancérigène	Induction :		
			prophage	colicino- genèse	
			$B.m.(1+)$ * $P.p.(8+)$	$E.c.(1+)$ *	$E.c.$ ML *
rayons U.V.	+	+	+	+	+
rayons X	+	+	+	-	-
bis-(β -chloroéthyl)-méthylamine	+	+	+	+	+
chloroéthyl diméthylamine	0	0	0	-	-
eau oxygénée en milieu inorganique	0	-	0	-	-
eau oxygénée en milieu organique	+	-	+	0	+
peroxyde de tertio butyl	+	+	+	-	+
tri-éthylène-imino-2:4:6-triazine-1:3:5	+	+	+	-	-
dioxyde de butadiène-1:3	+	+	+	-	-
éthyluréthane	+	+	0	-	-
bis-sulfonyloxyméthyl-1:4-butane **	-	+	0	-	-
diméthyl-9:10-benzanthracène-1:2, acétamino-2-fluorène, méthylcholanthrène, β -naphthylamine, benzidine	+	+	0	-	-

* *B.m.*, *Bacillus megatherium*; *P.p.*, *Pseudomonas pyocyanea*; *E.c.*, *Escherichia coli* ML.

** Substances peu solubles dans l'eau. Les résultats négatifs sont dépourvus de signification.
+, action mutagène, cancérigène ou inductrice; 0, sans action; —, effet non étudié.

Il s'était révélé, avant que ne soit découverte l'efficacité de l'eau oxygénée, que la méthyl-bis- β -(chloroéthyl)amine est inductrice (F. Jacob [17]). D'autres agents mutagènes, peroxydes organiques, époxydes, éthylèneimines sont également inducteurs (A. Lwoff et F. Jacob [13] (voir tableau I).

On notera que les inducteurs de développement du prophage peuvent provoquer des mutations chez les bactéries, chez *Neurospora* et chez la drosophile ainsi que des ruptures chromosomiques chez les plantes. K. A. Jensen, I. Kirk, G. Kolmark et M. Westergaard [18] ayant discuté l'ensemble des résultats obtenus dans ce domaine, il est inutile d'y insister. Il convient d'ajouter que de nombreux agents mutagènes sont carcinogènes. Ceci est vrai, non seulement pour les rayons U. V. et X, mais aussi pour les mutagènes chimiques comme les halogéno-alkoylamine (E. Boyland et E. S. Horning [19]), J. Heston [20] et aussi les époxydes et les éthylèneimines ; les travaux du *Chester Beale Institute* relatifs à ces agents ont fait l'objet d'une mise au point de E. Boyland [21]. La comparaison de l'action inductrice, mutagène et carcinogène des divers composés est donnée dans le tableau I. Les résultats négatifs, quant à l'induction du développement du prophage, obtenus avec les carcinogènes non hydrosolubles, ne sauraient être interprétés en raison de l'absence de toute donnée sur leur pénétration dans les bactéries. La seule substance mutagène et cancérigène hydrosoluble qui n'ait pas montré d'activité inductrice est l'éthyluréthane.

Tous les agents mutagènes et cancérigènes ne sont donc pas inducteurs du développement du prophage. Mais tous les agents physiques et toutes les substances essayés jusqu'ici, qui induisent le développement du prophage ou la synthèse de la colicine, sont mutagènes et cancérigènes. Bien entendu, l'activité de nombreux autres mutagènes et cancérigènes sur diverses souches lysogènes ou bactériocinogènes inductibles devra être examinée avant que les relations entre mutagènes, cancérigènes et inducteurs ne prennent leur pleine valeur.

INDUCTIBILITÉ ET NON INDUCTIBILITÉ.

1° L'inductibilité est-elle liée à une propriété du prophage ou des bactéries ? Les expériences de H. Ionesco [22] portant sur le prophage (1+) et (2-) de *B. megatherium* permettent de répondre à cette question. (Les prophages inductibles sont affectés du signe +, les non inductibles du signe -). Le prophage (1+) est inductible dans les souches 899 (1+), M (1+) et 17 (2-) (1+). Le prophage (2-) n'est inductible ni dans 17 (2-) ni dans M (2-). L'inductibilité est, dans ce cas, manifestement liée aux

propriétés héréditaires du prophage et indépendante de la souche bactérienne (1).

Le même phénomène a été retrouvé chez *Pseudomonas pyocyanea*. Le prophage (1—) n'est pas inductible quelle que soit la souche bactérienne lysogène qui le perpétue. Le prophage (8+) est inductible. L'irradiation de *P. pyocyanea* (8+) (1—) entraîne la production du seul phage (8+) (F. Jacob [23]). Ici encore, inductibilité et non inductibilité apparaissent comme des propriétés stables du prophage. Ces propriétés sont cependant susceptibles de varier.

La souche 899 (1+) de *B. megatherium* a produit de 1948 à 1951 des phages donnant uniquement de grandes plages sur la souche M. En octobre 1951, de petites plages ont fait leur apparition. Les phages (1g+) et (1p+) ont été isolés et on a obtenu 4 souches lysogènes inductibles : Mox (1g+) et M (1g+) donnant uniquement de grandes plages, et Mox (1p+) et M (1p+) donnant uniquement de petites plages.

Après quelques semaines la souche Mox (1p+) était devenue non inductible, soit Mox (1p—). Le nouveau phage 1p— lysait la souche M (1p+). Celle-ci, d'ailleurs, étalée seule sur boîte de Petri, montrait des plages de lyse. Tout se passait comme si une certaine proportion de bactéries M (1p+) produisaient un nouveau phage (1p—) capable de se reproduire dans M (1p+). Le nouveau phage ne pouvait être qu'un mutant du phage originel (1p+). Peu après, la souche originellement M (1p+) se montrait comme sa congénère Mox, uniquement constituée par des germes (1p—). Les deux souches Mox (1p+) et M (1p+) inductibles étaient donc devenues non inductibles à quelques semaines d'intervalle. Le prophage inductible p+ a donc apparemment disparu.

Quoi qu'il en soit, ce qui nous intéresse c'est le fait qu'un prophage puisse passer de l'état inductible à l'état non inductible.

L'inductibilité n'est cependant pas toujours liée uniquement à une propriété du prophage. En effet, lysogénisant *E. coli* C par des phages tempérés λ produits par la souche lysogène inductible *E. coli* K12 (λ +), on obtient des souches lysogènes dont certaines sont inductibles et d'autres non (E. Wollman, résultats inédits). Il semble donc que, suivant les cas, l'inductibilité soit une propriété, ou bien du prophage, ou bien du système lysogène. Elle pourrait dépendre alors de la façon dont s'est établi l'« équilibre » entre le prophage et la bactérie-hôte.

(1) D'après des résultats inédits de L. Siminovitch et H. Ionesco, les deux phages 1 et 2 présentent la même sensibilité au rayonnement ultra-violet.

L'APTITUDE.

L'irradiation des germes inductibles n'est pas nécessairement suivie par le développement des phages. Les effets inducteurs du rayonnement ultra-violet dépendent en effet, non seulement de la nature du prophage, mais aussi de l'état physiologique du germe. On a appelé aptitude la propriété de réagir aux agents inducteurs par le développement du bactériophage. On a constaté, en effet (A. Lwoff, L. Siminovitch et N. Kjeldgaard [7], A. Lwoff [24]), que l'efficacité d'une dose donnée d'ultra-violet dépendait de l'état physiologique de la bactérie : *Bacillus megatherium* cultivé en milieu synthétique n'est induit que par des doses d'U. V. beaucoup plus élevées que celles nécessaires pour induire les bactéries cultivées en milieu levuré.

Une bactérie sera qualifiée d'apte ou d'inapte suivant quelle se trouve dans un état lui permettant de produire des bactériophages après action d'un agent inducteur. La façon la plus simple de diminuer ou de supprimer l'aptitude est de soumettre les bactéries à une carence prolongée.

Se sont révélées efficaces : la carence glucidique chez *Pseudomonas pyocyanea* (F. Jacob [25]) et *Bacillus megatherium* (A. Lwoff [24]), la carence glucidique ou la carence en méthionine et en thréonine chez des mutants déficients de *E. coli* K12 (E. Borek [26]).

P. pyocyanea soumis à un jeûne glucosé de douze heures est incapable, après addition de glucose, de commencer d'emblée une croissance exponentielle : il y a une phase de latence d'environ quarante minutes. Les bactéries carencées ont une aptitude très réduite. Celle-ci se trouvera restaurée précisément au moment où les bactéries, quarante minutes après l'addition de glucose, peuvent de nouveau, croître exponentiellement. Les deux principales modifications apportées par le jeûne sont une diminution du nombre des bactéries induites par une dose donnée d'U. V. et une diminution de la sensibilité des bactéries restant inductibles à l'égard de l'effet inducteur de l'U. V. Ces deux effets représentent d'ailleurs peut-être des expressions différentes d'un même phénomène (F. Jacob [25]).

Si des bactéries lysogènes sont irradiées, puis soumises à une carence, elles produiront des phages, mais, naturellement, après addition de la substance qui faisait défaut. Ceci est vrai pour *P. pyocyanea* carencé en glucose, pour *E. coli* K12 carencé en méthionine ou en thréonine. La carence, dans ce cas, ne supprime pas l'effet de l'agent inducteur. Elle empêche simplement le développement du prophage induit. Ce développement se produit lorsque la substance qui faisait défaut est fournie à la bactérie.

LA RÉVERSION DE L'INDUCTION.

Dans une bactérie induite, le prophage se développe en bactériophage et la bactérie est lysée. Bloquons le développement du prophage. Ou bien la bactérie a subi une lésion irréversible et ne donnera pas de descendants, ou bien la bactérie survivra, c'est-à-dire donnera naissance à une colonie.

Si *P. pyocyanea* induit est soumis à un rayonnement visible à temps variable après l'irradiation U. V., on constate par exemple que 80 p. 100 des bactéries traitées immédiatement après le choc inducteur ne donnent pas de centres infectieux et qu'une forte proportion donne naissance à une colonie. Tous les clones sont lysogènes. La réversion peut être obtenue jusqu'à la vingtième minute ; la durée de la phase latente dans les conditions de l'expérience étant de quatre-vingt-cinq minutes (F. Jacob, résultats inédits).

On peut aussi soumettre *P. pyocyanea* en milieu synthétique à une certaine dose de rayonnement ultra-violet. L'étalement sur une souche sensible gélosée, après cinquante minutes, révélera que plus de 90 p. 100 des bactéries ont été induites et produisent des phages. Mais si l'étalement sur la souche sensible est fait aussitôt après l'irradiation, la proportion de bactéries qui donne des phages n'est plus que 20 à 30 p. 100.

La production de phage a donc été arrêtée dans 60 p. 100 des germes environ par l'étalement sur gélose. L'étalement sur gélose sans souche indicatrice, immédiatement après l'irradiation, permet de constater que la moitié des bactéries qui, laissées en milieu synthétique, auraient été lysées, donnent des colonies. Ces colonies sont constituées par des germes lysogènes (F. Jacob [25]).

La réversion par étalement sur gélose a été observée non seulement chez *Pseudomonas pyocyanea*, mais aussi chez *Escherichia coli* K12 (J. Weigle et M. Delbrück [27], chez *Bacillus megatherium* (A. Lwoff [24]) et *Salmonella typhi-murium* (résultats inédits). Il s'agit donc d'un phénomène assez répandu.

Chez *B. megatherium*, un autre type de changement de milieu, par exemple le passage de bouillon en milieu levuré, supprime également l'effet de l'induction (A. Lwoff [24]). Enfin, chez *B. megatherium* (1+) induit, le développement du bactériophage peut être arrêté par addition d'ions CO^{++} , Cu^{++} et Zn^{++} . Les bactéries survivent. L'effet des ions cobalt, cuivre et zinc est supprimé par le manganèse (K. Huybers [28]). La carence en manganèse, provoquée par les ions compétiteurs, empêche donc le développement du prophage et supprime l'effet de l'induction.

Le développement induit du prophage en phage peut donc être arrêté par divers traitements. Et puisque les bactéries induites et

réversées restent lysogènes, cela veut dire que le prophage induit, qui a commencé à se développer est revenu à l'état de prophage. On raisonne ici comme si le prophage lui-même, du fait de l'induction, avait subi une modification. Mais il reste possible que les inducteurs ont produit une modification bactérienne nécessaire au développement du prophage et que c'est cette modification qui a été réversée.

L'ensemble de ces expériences montre en tout cas, que les phénomènes induits par l'irradiation sont, dans une certaine mesure, réversibles, et qu'un système lysogène induit peut retourner à l'état lysogène originel.

*
* *

Pour qu'une bactérie lysogène produise des bactériophages après irradiation par le rayonnement ultra-violet, il faut donc :

1° Naturellement que le prophage soit inductible et que les bactéries soient placées après l'induction dans des conditions permettant le développement du phage ;

2° Que les bactéries soient dans un état physiologique déterminé appelé aptitude ;

3° Que la dose d'U.V. soit suffisante ;

4° Que les bactéries ne soient pas soumises à des actions restauratrices : lumière visible, étalement sur gélose, etc.

La production de bactériophages par une bactérie lysogène est ainsi sous la triple dépendance de facteurs génétiques, de conditions physiologiques phénotypiques et d'un stimulus qui, en dehors des cas de production spontanée, est apporté par des agents extrinsèques.

INDUCTION DE DÉVELOPPEMENTS ABORTIFS.

Bacillus megatherium 91 (1+) a été obtenu par lysogénisation d'une souche de *B. m.* 899 (1+) préalablement rendue non lysogène par la méthode de Clarke (1952). *B. m.* 91 (1) libère spontanément 1 phage pour 10⁵ bactéries. La souche irradiée, après la classique croissance résiduelle, se lyse mais ne libère pas de phages (A. Lwoff et L. Siminovitch [29]). On a conclu à l'absence de production de phages : a) parce qu'aucun phage n'a été mis en évidence à l'aide des souches détectives non lysogènes et toutes nos souches non lysogènes de *B. megatherium* sont sensibles à tous les phages connus de ce germe ; b) parce que l'examen du lysat au microscope électronique après centrifugation n'a pas révélé la présence de phages. De plus, l'étude biochimique montre qu'après induction, il y a blocage de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADRN). Mais ici la

période négative n'est pas suivie, comme cela a lieu normalement au cours du développement du phage, d'une période de synthèse rapide (L. Siminovitch [30]).

L'irradiation induit donc un développement abortif du prophage accompagné d'un arrêt de la synthèse de l'ADRN. Quelque défaut du système bactérie-prophage empêche la synthèse de l'ADRN phagique et c'est à ce défaut qu'il faut attribuer l'absence de formation de phages.

Des phénomènes analogues ont été observés chez *Pseudomonas pyocyanea*. Les clones lysogènes artificiels obtenus avec une même souche 13 se comportent de façon fort diversè. Dans certains clones toutes les bactéries induites produisent des phages, dans d'autres 1 bactérie sur 100 000. Des valeurs intermédiaires ont été trouvées pour d'autres souches (F. Jacob [25]). Cependant toutes les bactéries irradiées, qu'elles libèrent ou non des phages, se lysent.

L'interprétation de ces faits est ici difficile parce que la souche originale 13 se lyse partiellement après irradiation. L'examen au microscope électronique des bactéries induites en voie de lyse (L. et E. Kellenberger, résultats inédits) ne montre pas de bactériophages, mais révèle la présence de nombreuses formations en boudin dont la nature et la signification échappent et qui ne semblent pas avoir été décrites chez d'autres germes. Tout se passe comme si le développement de ces formations, induit par l'irradiation, était responsable de la lyse bactérienne.

Les agents inducteurs peuvent donc déclencher, suivant les cas, le développement du prophage en phage, le développement abortif du prophage, le développement de formations énigmatiques. Ils peuvent, enfin, déclencher la synthèse de deux bactériocines : la colicine et la pyocine (F. Jacob, L. Siminovitch et E. Wollman [31, 32]). La biosynthèse de ces deux protéines non infectieuses, est, elle aussi, létale.

L'ACTION DES INDUCTEURS.

ACTION CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES INDUCTEURS. — De nombreux travaux ont été consacrés aux effets des radiations et des agents mutagènes-cancérigènes sur les cellules et sur diverses substances telles que fibres collagènes, enzymes, acides nucléiques (2).

L'on sait que l'ypérite azotée se combine aux protéines et aux acides nucléiques. Son action a été rapportée à la formation de ponts intermoléculaires (Goldacre, Loveless et Ross [33]). Les

(2) Les articles de Bieseke, Philips, Tiersch, Burchenal, Buckley et Stock [35]; Philips [36]; Butler, Conway, Gilbert et Smith [37] comportent de bonnes mises au point de la question.

récents travaux de Butler, Press et James [34] ont conduit à la conclusion que l'ypérite azotée romprait des ponts hydrogène entre groupes aminés libres et groupes hydroxyle de deux bases puriques ou pyrimidiques adjacentes de la molécule d'acide nucléique, ponts responsables de la rigidité de la particule. Quoi qu'il en soit, l'acide désoxyribonucléique subit des modifications analogues sous l'influence des rayons X, des radicaux hydroxyles produits par voie chimique et des substances radiomimétiques comme les halogénures d'alkoylamine bifonctionnels. L'on sait enfin que certains mutagènes peuvent provoquer des ruptures chromosomiques.

En l'absence de toute donnée sur la base structurale de la spécificité du gène, le mécanisme de la mutation, et bien entendu aussi celui du mode d'action des mutagènes, nous échappe entièrement. Quoi qu'il en soit, une mutation génique spécifique est un évènement relativement rare. La probabilité faible s'explique si une mutation donnée est liée à un changement architectural spécifique tel qu'une modification définie dans la séquence d'une chaîne ordonnée de molécules de nucléotides puriques et pyrimidiques. L'induction du développement du phage, celui de la synthèse des bactériocines se présente quantitativement d'une façon fort différente de l'induction d'une mutation : c'est la quasi totalité des germes soumis à une dose convenablement choisie de l'agent inducteur qui sera contrainte de s'adonner à une nouvelle biosynthèse spécifique.

Avant de discuter du mécanisme possible de l'induction du développement du prophage et de la synthèse des bactériocines, il convient de tenter de se faire une idée du prophage.

NATURE ET SITUATION DU PROPHAGE. — Le prophage peut être considéré comme un facteur létal potentiel, caractère qui appartient à certains gènes. L'activité du prophage, comme celle des gènes responsables de la synthèse des enzymes adaptatifs, semble pouvoir être réduite à une simple reproduction.

L'activité fonctionnelle spécifique du prophage peut être déclenchée par des agents inducteurs, comme l'activité spécifique de certains gènes peut être induite par certaines substances. Dans un cas comme dans l'autre, l'expression est sous la dépendance de facteurs extrinsèques. Dans un cas comme dans l'autre, des protéines nouvelles seront synthétisées par les organismes « activés ».

L'ordre de grandeur de la production des phages par les bactéries lysogènes non inductibles est du même ordre que celui de l'apparition des mutations bactériennes. Les agents qui déclenchent le développement du prophage chez les souches inductibles sont des agents mutagènes.

Lorsque le phage T2 est adsorbé sur *E. coli*, l'acide désoxyribonucléique du phage pénètre seul dans la bactérie (Hershey [38]). L'ADRN semble bien être ici le substrat de la continuité génétique du phage dont il représente en quelque sorte le germe.

Ajoutons enfin que le caractère « lysogène » de *E. coli* K12 est lié au caractère galactose IV (E. et J. Lederberg [39], Elie Wollman [40]). Le caractère « lysogène » qui semble bien correspondre au prophage pourrait donc être fixé en une position déterminée d'un chromosome bactérien.

Cet ensemble de données permet de penser que le prophage est peut-être un acide désoxy-pentonucléique.

RELATIONS ENTRE DÉVELOPPEMENT INDUIT ET SPONTANÉ DU PHAGE.

-- Le développement du prophage en phage dans une bactérie lysogène, qu'il soit spontané ou induit par l'expérimentateur, pourrait relever de deux types de mécanismes : a) une modification du prophage ; b) une modification de la bactérie. L'étude de la souche lysogène *Pseudomonas pyocyanea* 13 (8+, 4+) perpétuant deux prophages, 8 et 4, pouvant se développer simultanément, va permettre de discuter utilement cette question (F. Jacob [23]).

Examinons d'abord ce qui se passe après induction. Les doses faibles de rayons U.V. induisent en général le développement d'un seul type de phage, 4 ou 8, les doses fortes induisent en général le développement des deux phages 4 et 8. On peut montrer que le développement de chacun des prophages est induit indépendamment de l'autre.

L'étude de la production spontanée de bactériophages a fourni d'utiles données. Dans la souche 13 (8, 4), une bactérie sur 600 libère spontanément des phages. Parmi les bactéries productrices de phages, 50 p. 100 donnent exclusivement du phage 4 ; 25 à 30 p. 100 exclusivement du phage 8 ; 20 à 25 p. 100, à la fois les phages 4 et 8.

Les causes primaires de la production spontanée peuvent être soit une mutation du prophage, soit une modification de la bactérie. L'hypothèse mutation du prophage n'est pas en accord avec les données expérimentales. Elle implique en effet une indépendance absolue dans la production de chacun des phages. Or, la probabilité pour une bactérie de produire spontanément les deux phages devrait être inférieure à 10^{-6} alors que les valeurs trouvées sont de l'ordre de 5.10^{-4} . L'hypothèse d'une mutation du prophage a donc été écartée par F. Jacob comme cause primaire de la production spontanée de phages par la souche 13 (8, 4).

Reste l'hypothèse d'une modification bactérienne. On a vu que certaines substances sont capables d'induire la production de

phages par les bactéries lysogènes. Il est possible que, chez un petit nombre de bactéries, un changement provoqué, soit par une mutation génique, soit par une perturbation phénotypique du métabolisme, provoque l'apparition d'une substance inductrice, par exemple un peroxyde organique. La substance inductrice pourrait apparaître en plus ou moins grande quantité, ce qui provoquerait le développement, soit des deux prophages, soit d'un seul. Le mécanisme du déclenchement du développement spontané des prophages chez les bactéries inductibles serait ainsi comparable à celui du déclenchement du développement induit.

Si cette conclusion est exacte, il doit exister un rapport entre la fréquence de la production spontanée, c'est-à-dire la probabilité pour une bactérie par cycle de division de produire du phage, et l'inductibilité des souches. C'est bien ce qui semble se passer pour les souches de *P. pyocyanea*. F. Jacob a examiné plusieurs souches lysogènes artificielles perpétuant le même prophage. Or, les souches où la fréquence de la production spontanée est la plus élevée sont précisément celles où l'efficacité inductrice de l'irradiation est la plus grande. De plus, dans la souche 13 (8+, 4+) une petite dose de rayons U.V. induit la formation de phages 4 chez 2 bactéries quand elle induit la formation de phages 8 chez 1 bactérie. Or, on trouve que la production spontanée de phages 4 est deux fois plus fréquente que celle des phages 8 (F. Jacob [23]).

Cette relation est encore plus accentuée entre systèmes inductibles et non inductibles. Chez *P. pyocyanea*, la fréquence de la production spontanée pour les souches non inductibles est beaucoup plus faible que pour les souches inductibles. Avec la souche 13 (8+, 1—), la probabilité pour une bactérie, par cycle de division, de produire le phage inductible 8+ est d'environ 10^{-3} , tandis que la probabilité de produire le phage non inductible 1— est de l'ordre de 10^{-5} . Dans les systèmes non inductibles, les agents qui, chez les systèmes inductibles, entraînent le développement du prophage sont inefficaces. Tout se passe comme si les systèmes non inductibles exigeaient, pour produire du phage, des modifications différentes des précédentes, et dont la rareté évoque celle des mutations bactériennes généralement étudiées.

MÉCANISME DE L'ACTION DES INDUCTEURS. — Deux hypothèses ont été envisagées par F. Jacob quant au mécanisme de l'induction :

Hypothèse 1. — Les rayons U.V. agissent sur le prophage soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire d'une substance médiatrice produite dans la bactérie. Le prophage est la « cible » pour les rayons ou les molécules de médiateur. L'effet primaire

sera alors hétérogène et distribué. Dans le cas du *P. pyocyanea* 13 (8+, 4+), le développement de chacun des prophages sera induit indépendamment de celui de l'autre.

Les inducteurs pourraient, par exemple, provoquer un changement du prophage qui le ferait passer d'un état inactif I à un état actif A. On doit considérer : 1° qu'il y a chez les bactéries lysogènes identité de propriétés du phage originel et des phages secondaires, donc vraisemblablement perpétuation d'une structure spécifique ; 2° que les inducteurs déclenchent le développement du prophage dans la quasi totalité des germes ; 3° que l'induction est réversible. Le changement supposé ne saurait être une modification architecturale spécifique dont la probabilité devrait être rare. Il pourrait être une modification des radicaux libres des bases puriques et pyrimidiques. De toute façon, on doit admettre que l'état I est instable et que la réaction $I \rightleftharpoons A$ est réversible.

L'on peut alors envisager l'hypothèse que les inducteurs provoqueraient la rupture d'un lien fragile du prophage avec le chromosome bactérien. L'état inactif I correspondrait au prophage fixé sur le chromosome, l'état actif A au prophage « libre ». La « réduction » du phage infectant en prophage correspondrait à la fixation sur un chromosome. On sait que les parties homologues de deux chromosomes peuvent s'attirer. La fixation du prophage sur le chromosome pourrait être la conséquence d'une analogie de structure entre le matériel infectant du phage et un secteur défini d'un chromosome bactérien.

Les agents inducteurs ou réverseurs feraient pencher dans un sens ou dans l'autre l'équilibre d'une réaction d'où dépendrait l'affinité du prophage pour le chromosome. Dans cette hypothèse l'inductibilité serait fonction de la labilité de la liaison du prophage avec le chromosome, et pourrait dépendre aussi, par exemple, du fait que le prophage est situé ou non à une extrémité du chromosome.

Toute conception relative au mécanisme de l'induction devrait pouvoir rendre compte de l'immunité des bactéries lysogènes vis-à-vis des phages, homologues ou non. Dans une bactérie lysogène c'est en effet, non seulement le prophage, mais aussi les phages infectants homologues qui sont dans l'incapacité de se développer. Tout se passe comme si la présence de la structure prophage empêchait une réaction nécessaire au développement. Dans l'hypothèse qui vient d'être discutée, le prophage bloquerait la réaction en question du fait même de sa présence sur le chromosome, par une sorte d'effet de position.

Hypothèse 2. — Les rayons U.V. agissent sur les bactéries en modifiant l'équilibre de certaines réactions. Le développement

du prophage n'est qu'un événement secondaire dont la probabilité dépend de l'état métabolique atteint par la bactérie. Deux mécanismes peuvent être considérés.

a) On sait que les bactériophages contiennent une ou des protéines antigéniques particulières qui n'existent pas dans les bactéries normales. On sait aussi que les bactéries colicinogènes non induites ne renferment pas de colicine. L'induction entraîne donc la synthèse de protéines nouvelles. Et l'hypothèse a été considérée, que la formation de ces protéines serait due à l'intervention de substances produites à la suite de l'action des inducteurs, et jouant vis-à-vis du prophage ou du « gène colicine », le rôle des substances inductrices dans la biosynthèse induite des enzymes.

b) Un autre schéma, dû à G. Stent (communication personnelle), fait intervenir un équilibre dynamique. Admettons que les divers éléments bactériens sensibles à l'action des U.V. (acides nucléiques, par exemple) soient étroitement interdépendants et qu'au contraire le prophage soit relativement indépendant. Toute action des inducteurs sur n'importe lequel des éléments bactériens entraînera une perturbation générale du métabolisme à la faveur de laquelle le prophage commencera son développement. La cible bactérienne étant beaucoup plus volumineuse que le prophage, on conçoit que la probabilité de l'induction soit beaucoup plus considérable que la probabilité de détruire le prophage.

Rappelons à ce propos que les phages T2, T4 et T6 ne renferment pas de cytosine, mais une cytosine hydroxyméthyl-5 (Wyatt et Cohen [41]). La déviation de la synthèse d'un désoxyriboside de type bactérien vers un désoxyriboside de type phagique pourrait rendre compte de l'arrêt de la synthèse de l'ADRN bactérien. Rappelons aussi que l'on ne connaît jusqu'ici qu'une seule réaction spécifique accompagnant le développement du bactériophage : c'est précisément l'arrêt de la synthèse de l'ADRN bactérien (L. Siminovitch et S. Rapkine [42], L. Siminovitch [43]). Naturellement, dans le cas des bactéries lysogènes, cet arrêt pourrait aussi bien être l'effet que la cause du développement du prophage en phage.

Le problème du mécanisme par lequel les agents mutagènes et cancérogènes, rayons U.V. et X, halogénures d'alkoylamines, éthylèneimines et époxydes, déclenchent le développement du prophage en phage et la synthèse des bactériocines, est, on le voit, loin d'être résolu. Les hypothèses qui viennent d'être discutées reflètent les discussions quotidiennes du laboratoire. On a cependant jugé utile, pour donner une idée de l'orientation des recherches actuelles, d'exposer non seulement les faits, mais aussi les hypothèses de travail.

L'INDUCTION DE DIVERS PHÉNOMÈNES PATHOLOGIQUES.

Dans quelle mesure d'autres phénomènes pathologiques observés ou provoqués chez divers animaux en l'absence d'infection peuvent-ils être rapportés au développement d'un prévirus en virus ?

Les cellules néoplasiques qui apparaissent à la suite de l'action des cancérigènes renferment des antigènes qui n'existent pas dans les cellules normales. Mais il ne semble pas que la formation d'un élément infectieux sous l'influence de cancérigènes ait été observée.

Cependant des particules infectieuses jouent un rôle déterminant dans le développement de certains cancers. Même si l'apparition de telles particules était constatée à la suite de l'application de cancérigènes, le problème de leur origine endogène ou extrinsèque resterait posé. Le fait que des virus néoplasiques, comme celui de Shope, passent facilement d'un état infectieux à un état non infectieux n'est pas pour faciliter la solution du problème.

L'on se souviendra que la transformation néoplasique dépend de la constitution génétique de l'animal, de facteurs hormonaux et d'agents extrinsèques, et que le développement du prophage en phage dépend aussi de nombreux facteurs. L'on se souviendra enfin que tous les agents inducteurs du développement du prophage sont des cancérigènes. A la lumière du modèle fourni par les bactéries lysogènes inductibles, il est aujourd'hui loisible de concevoir que certains cancérigènes pourraient induire le développement d'un virus à partir d'un prévirus ou bien déclencher le développement de plasmagènes nouveaux non infectieux, responsables de la propriété néoplasique.

D'autres phénomènes observés chez les insectes pourraient également être dus au développement d'un prévirus. Yamafugi et ses collaborateurs ont réussi à provoquer des maladies à polyèdres chez des vers à soie dont le régime est supplémente avec de l'acétoxime, de l'hydroxylamine ou du nitrate de potassium. D'après Yamafugi [44, 45] il y aurait, sous l'influence de ces substances, accumulation d'eau oxygénée qui transformerait une protéine ou une nucléoprotéine normale en virus. Osawa [46] a, d'ailleurs, réussi à obtenir le développement de la maladie à polyèdres par injection d'eau oxygénée à des chenilles. Il apparaît cependant que les substances inductrices pourraient agir aussi bien en diminuant la résistance du terrain, c'est-à-dire en permettant à un virus latent de se multiplier et de manifester son pouvoir pathogène, qu'en déclenchant le développement d'un prévirus en virus. Cette remarque est valable aussi pour les nombreux cas de maladies à virus dont K. Smith [47] a observé l'apparition chez diverses espèces de lépidoptères.

Seules, jusqu'ici, les bactéries lysogènes montrent avec certitude qu'une particule présentant les caractères d'un virus, en l'espèce un bactériophage, peut, sous l'effet de divers agents, être formée à partir de particules spécifiques non infectieuses transmises héréditairement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BORDET. *Ces Annales*, 1925, **39**, 717.
- [2] J. BORDET et E. RENAUX. *Ces Annales*, 1928, **42**, 1283.
- [3] F. M. BURNET et M. McKIE. *Austr. J. exp. Biol.*, 1929, **6**, 277.
- [4] E. et E. WOLLMAN. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 190.
- [5] A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 812.
- [6] A. LWOFF et A. GUTMANN. *Ces Annales*, 1950, **78**, 711.
- [7] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 815.
- [8] R. LATARJET. *Ces Annales*, 1951, **81**, 389.
- [9] A. LWOFF et L. SIMINOVITCH. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1146.
- [10] A. LWOFF et L. SIMINOVITCH. *Ces Annales*, 1952, **82**, 676.
- [11] A. LWOFF. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 366.
- [12] A. SCHÖBERL. *Zeit. Physiol. Chem.*, 1921, **201**, 167.
- [13] A. LWOFF et F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2308.
- [14] O. WYSS, J. B. CLARK, F. HAAS et W. S. STONE. *J. Bact.*, 1947, **56**, 51.
- [15] O. WYSS, S. STONE et J. B. CLARK. *J. Bact.*, 1947, **54**, 767.
- [16] F. H. DICKEY, G. H. CLELAND et C. LOTZ. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1949, **35**, 581.
- [17] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 433.
- [18] K. A. JENSEN, I. KIRK, G. KOLMARK et M. WESTERGAARD. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.*, 1951, **16**, 245.
- [19] E. BOYLAND et E. S. HORNING. *Brit. J. Canc.*, 1949, **3**, 118.
- [20] W. E. HESTON. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1950, **41**, 415.
- [21] E. BOYLAND. *Canc. Res.*, 1952, **12**, 77.
- [22] H. IONESCO. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1702.
- [23] F. JACOB. *Ces Annales*, 1952, **83**, 671-692.
- [24] A. LWOFF. *Ces Annales*, 1951, **81**, 370.
- [25] F. JACOB. *Ces Annales*, 1952, **82**, 443.
- [26] E. BOREK. *Bioch. Bioph. Acta*, 1952, **8**, 211.
- [27] J. WEIGLE et M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
- [28] K. HUYBERS. *Ces Annales*, 1953, **84**, 242.
- [29] A. LWOFF et L. SIMINOVITCH. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1397.
- [30] L. SIMINOVITCH. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1694.
- [31] F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. WOLLMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1500.
- [32] F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 295.
- [33] R. J. GOLDACRE, A. LOVELESS et W. C. J. ROSS. *Nature*, 1949, **163**, 667.
- [34] J. A. V. BUTLER, E. M. PRESS et D. W. F. JAMES. *C. R. II^e Congr. Int. Bioch.*, Paris, 1952 (*à l'impression*).

- [35] J. J. BIESELE, F. S. PHILIPS, J. B. THIERS, J. H. BURCHENAL, S. M. BUCKLEY et C. C. STOCK. *Nature*, 1950, **166**, 1112.
- [36] F. S. PHILIPS. *Pharm. Rev.*, 1950, **2**, 281.
- [37] J. A. BUTLER, B. E. CONWAY, L. GILBERT et K. A. SMITH. *Acta Un. Contra Cancer*, 1951, **7**, 443.
- [38] A. D. HERSHEY. *Ces Annales*, 1953, **84**,
- [39] E. et J. LEDERBERG. *Genetics*, 1953 (à l'impression).
- [40] E. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 281.
- [41] G. R. WYATT et S. S. COHEN. *Ces Annales*, 1953, **84**,
- [42] L. SIMINOVITCH et S. RAPKINE. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1603.
- [43] L. SIMINOVITCH. *Ces Annales*, 1953, **84**, 265.
- [44] K. YAMAFUGI et T. YUKI. *Bio. Z.*, 1948, **318**, 107.
- [45] K. YAMAFUGI, H. OMURA et F. YOSHIHARA. *Enzymologia*, 1951, **15**, 28.
- [46] M. OSAWA. In YAMAFUGI. *Rep. Agr. Tech. Kyushu Univ.*, 1952, **6**, 1.
- [47] K. M. SMITH. *Biol. Rev.*, 1952, **27**, 347.

CATIONIC REVERSION OF INDUCED PHAGE DEVELOPMENT IN *BACILLUS MEGATHERIUM* (1)

by KENNETH HUYBERS (2).

(Institut Pasteur, Paris. Service de Physiologie microbienne.)

Of the divalent metals implicated in the process of bacteriophage development, calcium is known to play an important role [1, 2]. It has also been shown that manganese may be involved in some phases of phage reproduction [3].

We have investigated the action of different divalent cations on phage development, in the system where phage production is induced in a culture of lysogenic *Bacillus megatherium* following exposure to ultra-violet light. It has been found that some cations are necessary whereas others exert an inhibitory action.

TECHNIQUE:

The strain of *Bacillus megatherium* used, was the lysogenic strain 899 (1 +). The experimental procedures have already been described [4]: briefly, cultures in the logarithmic phase of growth were submitted to ultra-violet irradiation, then incubated in a shaker, in the dark, at 37° C, while the optical density was followed with an electrophotometer. The dosage of ultra-violet light is expressed as ergs per square millimetre, at the surface of the liquid. The number of phage is estimated after the bacteria have been lysed by lysozyme, and is expressed as the number per cm³. The number of bacteria is expressed in units of the Meunier electrophotometer. An « optical density » of 100 corresponds to approximately 3.4×10^7 bacteria per cm³.

The following salts were used as source of the various cations:



(1) This work has been supported by a grant of the *National Cancer Institute of the National Institutes of Health of the United States of America*.

(2) *Permanent adress*: School of Bacteriology, University of Melbourne, Australie.

The following media were employed :

(1) *Broth* :

Dehydrated Difco broth	8 g
Distilled water	1 l

(2) *Oxine treated broth* :

Dehydrated Difco broth	8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
Ca(NO ₃) ₂	16 mg
KCl	1 g
Distilled water to	1 l

This medium was then subjected to extraction with 8 hydroxy-quinoline (oxine) and chloroform following the technique of Waring and Werkman [5]. In one instance the broth was subjected to 7 treatments (medium O.T.7) and in the other 12 treatments (medium O.T.12). Bacteria subcultured from an agar slope would grow in the extracted media for the first subculture, but further subcultures would not grow unless the media had been reinforced by the addition of essential cations.

1° ACTION OF MANGANESE ON PHAGE DEVELOPMENT. — The importance of manganese soon became apparent and is demonstrated in the following experiments.

The basal medium 1 is supplemented with Fe⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺ and K⁺ at the concentrations indicated in the legend of fig. 1. Samples are further supplemented with Mn⁺⁺ 10⁻⁶, 10⁻⁵ and 10⁻⁴ M. Bacteria are grown overnight in a shaker at 37° and subcultured in the morning in the corresponding media. Whilst in the exponential phase of growth, they are irradiated with ultraviolet light and resuspended again in the corresponding medium. The growth is followed and the number of phage is estimated (fig. 1 A).

No decrease of optical density was observed in the medium with Mn 10⁻⁶ M a slight lysis with Mn 10⁻⁵ M, and an almost complete lysis with Mn 10⁻⁴ M. The initial number of bacteria at time 0 being 1.7×10^7 per cm³ (calculated from the turbidity), and the number of phage 6.5×10^9 per cm³, the average burst size is 380.

Thus, ultra-violet irradiation is followed by phage development in only a small proportion of bacteria grown in the presence of Mn⁺⁺ 10⁻⁶ M, whereas phage development takes place in almost all bacteria grown with Mn⁺⁺ 10⁻⁴ M. The normal process of phage production and bacterial lysis will thus only occur when the concentration of manganese is above a critical level.

A similar experiment is illustrated in fig. 1B. Here the basal medium was oxine treated broth (O. T. 12), supplemented with various ions, but without manganese. Bacteria were grown,

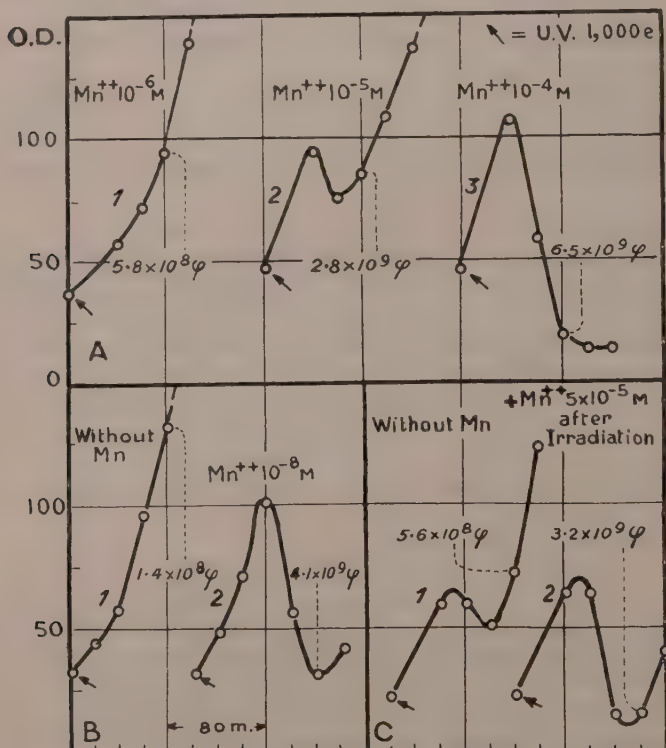


FIG. 1. — Action of manganese.

- A. The medium 1 is supplemented with $Fe^{++} 10^{-6} M$, Co^{++} and $Zn^{++} 10^{-8} M$, $KCl 4,3 \times 10^{-2} M$ and with $Mn^{++} 10^{-6} M$ (1), $10^{-5} M$ (2) and $10^{-4} M$ (3). Three parallel cultures are grown, irradiated and diluted, in the respective concentration of manganese.
- B. A similar experiment conducted in oxine treated medium (O. T. 12), supplemented with $Fe^{++} 10^{-6} M$, Co^{++} , Cu^{++} and $Zn^{++} 10^{-8} M$, but without added Mn^{++} (1), and with $Mn^{++} 10^{-8} M$ (2).
- C. Bacteria are grown and irradiated in oxine treated medium without added manganese, but supplemented with the same ions as in Fig. 1B (1). After irradiation they are diluted in the same medium (1), and in this medium supplemented with $Mn^{++} 5 \times 10^{-5} M$ (2).

irradiated and diluted in this medium after the technique described above. In the control, no lysis is evident and there is only a small number of phage produced (fig. 1B, curve 1). If the basal

medium has been supplemented with Mn^{++} 10^{-8} M, and the same procedure followed with a parallel culture, then normal lysis and phage production occur (fig. 1 B, curve 2).

It can be seen that in the oxine-treated medium, a much smaller concentration of manganese is effective than in the non-extracted medium, 10^{-8} M as compared with 10^{-4} M. This can be explained by the fact that, as the oxine treated medium is deficient in the various cations able to compete with manganese, a much smaller amount can be effective in establishing a favourable ionic balance. In fact, as such small amounts were active in this medium, it proved at times difficult to completely suppress phage production and bacterial lysis in non-supplemented media, and in such cases, a partial lysis often occurred (see fig. 1 C, curve 1). In such instances however, the beneficial effect of an adequate amount of manganese was always apparent.

It should be noted that manganese is known as essential for bacterial development. Bacteria would therefore be unable to grow in a medium which is devoid of manganese. The fact that the oxine treated broth supplemented with iron supports bacterial growth proves that some manganese is present, which is sufficient for the synthesis of bacterial substance, but does not allow phage production to occur after ultra-violet irradiation.

The question now arises, does manganese affect the aptitude of the bacteria? That is, are bacteria cultured in conditions of manganese insufficiency « inapt » while those cultured in the presence of a favourable manganese balance are « apt »? In order to answer this question, bacteria were grown in the oxine treated medium O. T. 12, supplemented with the various cations as indicated in the legend (fig. 1 C), but without manganese. After irradiation, they were diluted [1] in this same medium and [2] in this medium supplemented with Mn^{++} 5×10^{-5} M. It can be seen (fig. 1 c) that in the first case, a slight lysis occurred, as mentioned above, even though there is no added manganese. In the second case however there was full lysis and a normal phage production. Thus, although cultured in conditions of manganese deficiency, the bacteria are still « apt », but phage production will not follow in all bacteria unless enough manganese is present. Manganese is therefore not essential for the process of induction, but necessary for some stage in the development of the prophage into phage.

From the above experiments, it can be concluded that the concentration of manganese required for phage development is higher than the concentration needed for bacterial growth, or better, that phage development is more susceptible to manganese insufficiency than is bacterial growth.

2° ACTION OF ZINC, COBALT AND COPPER. — These metals, if present in sufficient concentration proved to have an inhibitory action.

The action of cobalt is illustrated in fig. 2 A. A culture is grown overnight in medium O. T. 7, supplemented with the various ions as indicated in the legend. It is irradiated and diluted in the same medium. Phage production and lysis follow (fig. 2 A, curve c). If however cobalt is added to the medium to give a concentration of 5×10^{-5} M, and the bacteria are grown, irradiated and diluted in the presence of this amount of cobalt, then there is only a slight inflexion in the growth curve, and a greatly

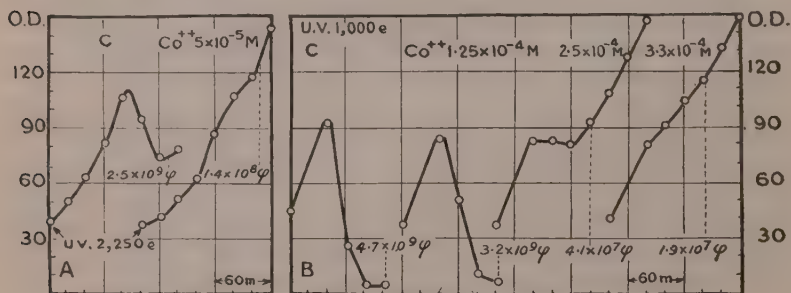


FIG. 2. — Inhibition by cobalt.

- A. Cultures in oxine treated medium (O.T.6), supplemented with $\text{Fe}^{++} 5 \times 10^{-7}$ M, and $\text{Mn}^{++} 2 \times 10^{-6}$ M (C); and in this medium further supplemented with $\text{Co}^{++} 5 \times 10^{-5}$ M.
- B. A culture in medium 1 is irradiated, then diluted in the same medium (C), and in this medium supplemented with cobalt in the concentrations indicated. Supplementary ions present are $\text{Fe}^{++} 10^{-6}$ M, $\text{Mn}^{++} 10^{-7}$ M, Co^{++} and $\text{Zn}^{++} 10^{-8}$ M, $\text{Mg}^{++} 10^{-3}$ M, KCl 1, 3×10^{-2} M.

decreased phage production, about 6 p. 100 that of the former.

Cobalt can also exert an inhibitory action if added after the ultra-violet irradiation. This is illustrated in the following experiment (fig. 2 B) in which the basal medium 1 is supplemented with the various ions indicated. A culture is grown, irradiated and diluted in this medium : phage production and lysis follow (fig. 2 B, curve c).

It can be seen however that, if 3.3×10^{-4} M cobalt is added to the medium after the culture has been irradiated, there is no decrease of turbidity. The ratio phage/bacteria 100 minutes after induction is approximately 0.5, a low figure which is even less than the normal ratio of 3 to 10 when bacteria are grown in broth without having been irradiated.

Zinc ions have a similar inhibitory effect. A culture grown in

oxine treated medium (O. T. 12), supplemented with various ions, is irradiated with varying doses of ultra-violet light. If it is then diluted in the same medium phage production and lysis follow (upper part of fig. 3). If however, after irradiation, the culture is diluted in this same medium supplemented with

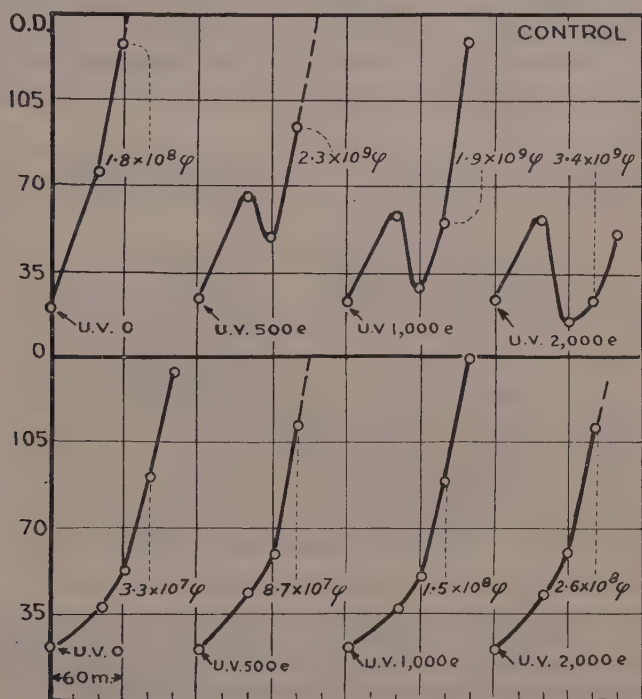


FIG. 3. — *Inhibition by zinc.*

Bacteria are grown and irradiated in O.T.12 medium, supplemented with $\text{Fe}^{++} 10^{-6}$ M, and with Mn^{++} , Co^{++} , Cu^{++} and $\text{Zn}^{++} 10^{-8}$ M. After irradiation they are diluted in the same medium (upper part of figure), and in this medium supplemented with 5×10^{-5} M Zn^{++} (lower part).

5×10^{-5} M zinc, then phage production is greatly decreased and no lysis is observed (lower part of fig. 3).

A similar experiment is illustrated in fig. 4. Here the addition of 10^{-4} M Zn^{++} immediately after irradiation inhibits phage production. When added 10 minutes after irradiation, the inhibition is only partial. This suggests that the action of zinc is on an early phase of phage development.

Copper was found to have a similar inhibitory effect, at a concentration of 5×10^{-6} M (fig. 5 B, curve 1).

Numerous attempts have also been made to demonstrate any necessity for copper in the process of phage development. With the exception of one or two experiments which gave a positive indication, the results were negative. As copper is known to be essential for microbial growth, and as bacterial growth was always obtained in the medium used (oxine treated broth not supplemented with copper), it must be concluded that a certain amount of copper was always present. The negative results therefore do not allow of any conclusions regarding the necessity of copper for phage development.

3° REVERSAL, BY MANGANESE, OF THE INHIBITORY ACTION OF COBALT, ZINC AND COPPER. — Examples of ion antagonism in bacterial

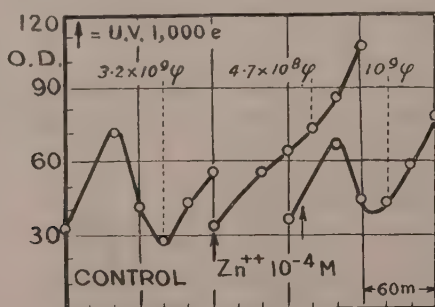


FIG. 4. — Action of zinc.

Bacteria are grown and irradiated in oxine treated medium (O.T.7), supplemented with $\text{Fe}^{++} 10^{-7}$ M and Mn^{++} , Co^{++} , Cu^{++} and $\text{Zn}^{++} 10^{-8}$ M.

They are diluted after irradiation in the same medium. $\text{Zn}^{++} 10^{-4}$ M is added immediately after the irradiation, and ten minutes after the irradiation.

growth are furnished in the studies of MacLeod and Snell [6] who showed that the action of zinc in preventing the growth of *Lactobacillus arabinosus* can be reversed by Mn^{++} , Ca^{++} , Sr^{++} and Mg^{++} . Abelson and Aldous [7] have also shown that the action of Ni^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Z^{++} and M^{++} in preventing growth of *Escherichia coli* is reversed by Mg^{++} .

The inhibitory action of many ions seems to be due to a competition with an essential ion for an essential enzyme. A competition of this type has been extensively studied by Cohn and Monod [8] using the galactosidase of *E. coli*.

A similar ion competition appeared to be acting in the present study, and it was found that the inhibitory action of cobalt, zinc, or copper could be reversed by manganese.

Bacteria are grown in oxine treated medium (O. T. 12) supple-

mented with various ions and with 2×10^{-5} M zinc, a concentration known from previous experiments to be inhibitory. The culture is irradiated and diluted in this medium. It can be seen (fig. 5 A, curve 1) that there is no lysis and only a small yield of bacteriophage. If the medium has also been supplemented with manganese 2×10^{-4} M, then, in a similar culture, treated in the same fashion, a considerable proportion of the bacteria produce phage, and are lysed (fig. 5 A, curve 2).

Fig. 5 B shows another experiment in which the same technique

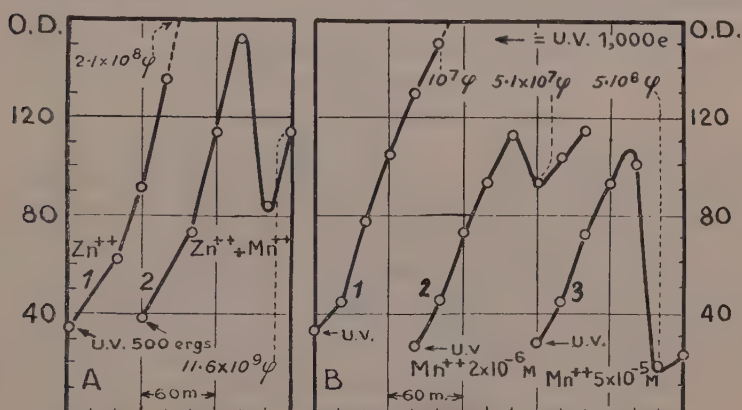


FIG 5. — A. Manganese release of inhibition by zinc.

Medium (1) is O.T.12 medium supplemented with Fe^{++} 40×10^{-6} M, Mn^{++} and Co^{++} 40×10^{-8} M, and with Zn^{++} 2×10^{-5} M.

Medium (2) is the same, but with the further addition of Mn^{++} 2×10^{-4} M. Parallel cultures are grown, irradiated and diluted in these two media.

B. Manganese release of inhibition by copper.

A similar experiment to the previous one (Fig. 5 A).

Medium (1) is O.T.7 medium supplemented with Co^{++} and Zn^{++} 3×10^{-7} M and with Cu^{++} 5×10^{-6} M.

Media (2) and (3) have been further supplemented with Mn^{++} 2×10^{-6} M and Mn^{++} 5×10^{-5} M respectively.

is followed. Organisms are cultured in oxine treated medium (O.T.7), supplemented with the ions indicated, and with 5×10^{-6} M Cu^{++} , a concentration known to be inhibitory in this medium. It can be seen that after irradiation, there is no decrease in optical density, and only a small number of bacteriophage is produced. If the medium is supplemented with Mn^{++} 5×10^{-5} M, and cultures are grown and treated in the same way, then there is lysis of the bacteria together with liberation of phage.

Cobalt inhibition can also be overcome by manganese in a similar fashion.

These results are in agreement with the preceding conclusion concerning the necessity of manganese for phage development. Cobalt, zinc and copper block phage development because they displace manganese from at least one system necessary for this process. Similarly, as phage development is more susceptible to manganese insufficiency than is bacterial growth, so is phage development more sensitive to zinc, cobalt and copper than is bacterial synthesis. These conclusions are of course for the

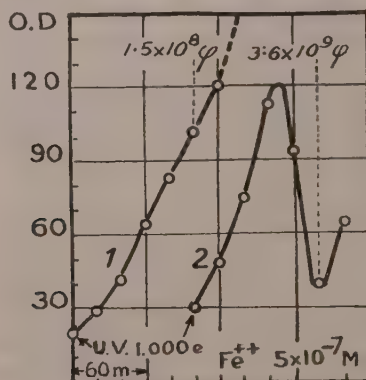


FIG. 6. — Action of Iron.

Culture (1) is in O.T.12 medium supplemented with $Mn^{++} 5 \times 10^{-7} M$.

In culture (2) the medium has been further supplemented by the addition of $Fe^{++} 5 \times 10^{-7} M$.

time being, only valid for *Bacillus megatherium* and phage 1+.

4° ACTION OF IRON. — The other metal investigated was iron. That Fe^{++} also plays an important role is shown by the following experiment (fig. 6). A culture grown overnight in oxine treated medium (O. T. 12), supplemented with manganese, is subcultured once, then irradiated and diluted in the same medium. No decrease of optical density is observed, and phage production is poor. If the medium has also been supplemented with $Fe^{++} 5 \times 10^{-7} M$, then a culture grown, irradiated and diluted in this medium, will produce the normal number of phage, and lyse.

If bacteria are cultured and irradiated in an iron deficient medium, the addition of iron after the irradiation will not lead to an increased phage production. This is in contrast to the findings previously described for manganese. However, the

addition of iron to the culture 20 minutes before irradiation, followed by resuspension in a medium with the same concentration of iron, will increase the phage production by a factor from 2 to 10.

In the case of iron, as in the case of manganese, the production of phage is more sensitive to deficiency of the metal than is bacterial development. Iron concentrations allowing bacterial growth, although at a reduced speed, do not allow phage development after ultra-violet irradiation.

The fact that in order to be effective, iron has to be added some time before irradiation means that some substances or systems have to be synthesized in order to restore the capacity for phage production.

DISCUSSION.

It thus appears that the process of bacteriophage development in *Bacillus megatherium* (1+), is more exacting toward manganese than is the process of bacterial growth. Conditions of manganese insufficiency sufficient to depress phage development can be arrived at by culturing the bacteria either in a medium deficient in manganese, or in the presence of sufficient concentration of competitive ions (Co^{++} , Zn^{++} and Cu^{++}). It should be noted that although the bacteria are able to grow under these conditions, they do so at a reduced rate. This can be seen in the various graphs.

Manganese is known to be involved in other phage systems. Spizizen, Hampil and Kenney [3] have shown that sulphhydryl compounds retard the « liberation » of the coliphage T2r+. The ionic buffering agent « versene » can protect against this inhibition, and this protective action is enhanced by the presence of manganous or magnesium ions. It is not known however whether the delayed liberation was due to an action on the multiplication of the phage, or on the lysis of the bacteria. According to Heden [9], cobalt 10^{-4} M decreases the burst size of the bacteriophage T in *Escherichia coli*.

In our experiments in which cobalt and zinc were added after irradiation, the concentration necessary to depress phage development was 3 000 times the concentration of manganese already present in the medium in the case of cobalt, and 5 000 and 10 000 times in the case of zinc. The true effective ratio is difficult to estimate. It would depend on the concentration of free cations, that is on the nature and amount of the various chelating substances present in the medium. The ratio inside the bacteria would of course depend among other factors, on the speed of absorption and on the length of time the bacteria had been exposed to the various ions.

It should be noted that the mode of action of iron has not been solved. It could be that some system synthesized in the presence of iron is necessary for « aptitude », or for bacteriophage development, or for both « aptitude » and phage development.

It should be remembered here : a) That organic peroxides can induce bacteriophage production in some lysogenic systems [40]. b) That when non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* are lysogenised with a certain type of temperate phage, the lysogenic strains are toxigenic [41]. As toxin production is intimately bound to iron metabolism, this could mean that factors controlling iron metabolism play an important role in the stability of lysogenic systems.

SUMMARY.

1° *Bacillus megatherium* (1+) grown in broth, will produce phage after irradiation with ultra-violet light. Development of phage does not take place when the medium is deficient in manganese.

2° If deficient media are supplemented with manganese, phage development will occur after irradiation.

Development will occur equally well if bacteria have grown in the presence of excess manganese, or if manganese is added after irradiation.

3° Bacterial growth is less exacting toward manganese than is phage development.

4° If a medium allowing phage development is supplemented with cobalt, zinc or copper at a certain concentration, phage development does not follow irradiation. Cobalt and zinc also inhibit phage development when added after irradiation.

5° The concentrations of cobalt, zinc and copper which suppress phage production, do not block bacterial growth.

6° The inhibitory effect of cobalt, zinc and copper on phage development is reversed by manganese.

The inhibition of phage development by cobalt, zinc and copper is probably due to a displacement of manganese from a position essential in this process.

7° Bacteria deficient in iron, but still able to grow, may be unable to support phage development. Addition of iron after irradiation does not lead to phage development. In order to restore phage development iron has to be added 20 minutes before irradiation.

REFERENCES

- [1] M. H. ADAMS. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 505.
- [2] P. FILDES, D. KAY and W. JOKLIK. In « *The Nature of Virus Multiplication* » Oxford Univ. Press, 1952.

- [3] J. SPIZIZEN, B. HAMPIL and J. KENNEY. *J. Bact.*, **62**, 331.
- [4] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH and N. KJELDGAARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 815.
- [5] W. WARING and C. WERKMAN. *Arch. Biochem.*, 1942, **1**, 303.
- [6] R. A. MACLEOD and E. E. SNELL. *J. Bact.*, 1950, **59**, 783.
- [7] P. H. ABELSON and E. ALDOUS. *J. Bact.*, 1950, **60**, 401.
- [8] M. COHN and J. MONOD. *Biochim. et Biophys.*, 1951, **7**, 153.
- [9] C. HEDEN. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 1951, Supp. 88.
- [10] A. LWOFF and F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2308.
- [11] V. J. FREEMAN. *J. Bact.*, 1951, **61**, 675.

INFLUENCE DU RÉGIME CARBONÉ SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIOPHAGES (1)

PAR FRANÇOIS JACOB.

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

INTRODUCTION.

Il est possible, dans certaines conditions, de faire varier le taux de la croissance bactérienne en réglant le taux d'un seul des facteurs indispensable à la nutrition des bactéries. C'est le principe des appareils à culture continue (Monod, 1950 ; Novick et Szilard, 1950), dans lesquels une fraction donnée de la culture est constamment remplacée par une quantité équivalente de milieu neuf contenant le facteur « limitant » dont la concentration règle la croissance. Il est également possible, dans certains cas, de régler le taux de croissance par l'emploi de systèmes enzyme-substrat dont la réaction libère de façon continue l'aliment limitant la croissance (Jacob, 1952).

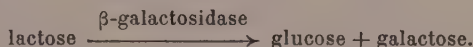
Pour analyser l'utilisation d'un facteur essentiel, l'aliment carboné par exemple, consommé par les bactéries pendant le développement des bactériophages, il est nécessaire d'employer de tels systèmes d'alimentation continue. En faisant varier le taux de glucose utilisable par les bactéries, on a ainsi étudié les modifications apportées, d'une part au développement du phage, d'autre part au métabolisme bactérien pendant la période latente. Dans les conditions habituelles de culture, lorsque aucun des facteurs du milieu n'est limitant, le degré d'interférence du phage sur la bactérie varie suivant le système phage-bactérie considéré. Comme l'a montré Siminovich (1953), on peut distinguer, à l'égard d'une même souche bactérienne, des phages virulents et des phages tempérés. En modifiant le régime carboné auquel sont soumises les bactéries pendant le développement des phages, on peut mettre en évidence une autre différence importante entre phages virulents et phages tempérés (Jacob, 1952). Les systèmes employés pour ces expériences étaient formés d'une souche de *Pseudomonas*

(1) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du National Cancer Institute of the National Institutes of Health des Etats-Unis d'Amérique.

pyocyanea et de deux bactériophages, dont l'un se comporte à l'égard de cette souche comme un phage virulent et l'autre comme un phage tempéré.

PRINCIPE DES EXPÉRIENCES.

Les souches 13 et 13 (8) de *P. pyocyanea* peuvent utiliser le glucose comme source de carbone, mais pas le lactose, ni le galactose. Les cultures de ces bactéries, préalablement carencées, sont mises en présence du système lactose + β -galactosidase qui effectue la réaction :



Les bactéries ne peuvent alors utiliser que le glucose libéré par la réaction. Ces systèmes enzyme-substrat se sont révélés stables pendant la durée des expériences. Comme, aux dilutions employées, la réaction est d'ordre zéro, on peut définir pour une concentration bactérienne donnée, un régime d'alimentation qui est le nombre de molécules de glucose libérées par heure et par ml de suspension. Les régimes sont réglables, car ils sont sensiblement proportionnels à l'inverse de la dilution de l'enzyme quand le lactose est en excès.

Les expériences consistent donc à infecter ou à irradier des suspensions bactériennes préalablement carencées en aliment carboné pendant une heure, de manière à épuiser la majeure partie de leurs réserves. En présence d'un excès de lactose, on ajoute une même quantité de dilutions variables d'une β -galactosidase (lactase) obtenue à partir de cultures d'*Escherichia coli* (Cf. Cohn et Monod, 1951).

INFLUENCE DU RÉGIME CARBONÉ SUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE.

Comme on le voit sur la figure 1, l'addition d'un excès de glucose à la suspension carencée de bactéries 13 (8) entraîne la reprise immédiate de la croissance exponentielle. Le temps de génération est d'environ soixante-dix à soixante-quinze minutes. L'addition de lactose et de β -galactosidase peu diluée donne le même résultat. Si l'on dilue un peu plus la β -galactosidase, la croissance est d'abord exponentielle, puis devient linéaire et ceci d'autant plus tôt que la dilution de l'enzyme est plus grande, pour une même concentration initiale de bactéries. Enfin, avec de grandes dilutions de la β -galactosidase, la croissance est d'emblée linéaire et la pente de la courbe de croissance est sensiblement proportionnelle à l'inverse de la dilution.

Lorsque l'enzyme est suffisamment diluée, le régime carboné limite donc la vitesse de la croissance bactérienne. Comme la réaction enzymatique est d'ordre zéro, le régime est constant et

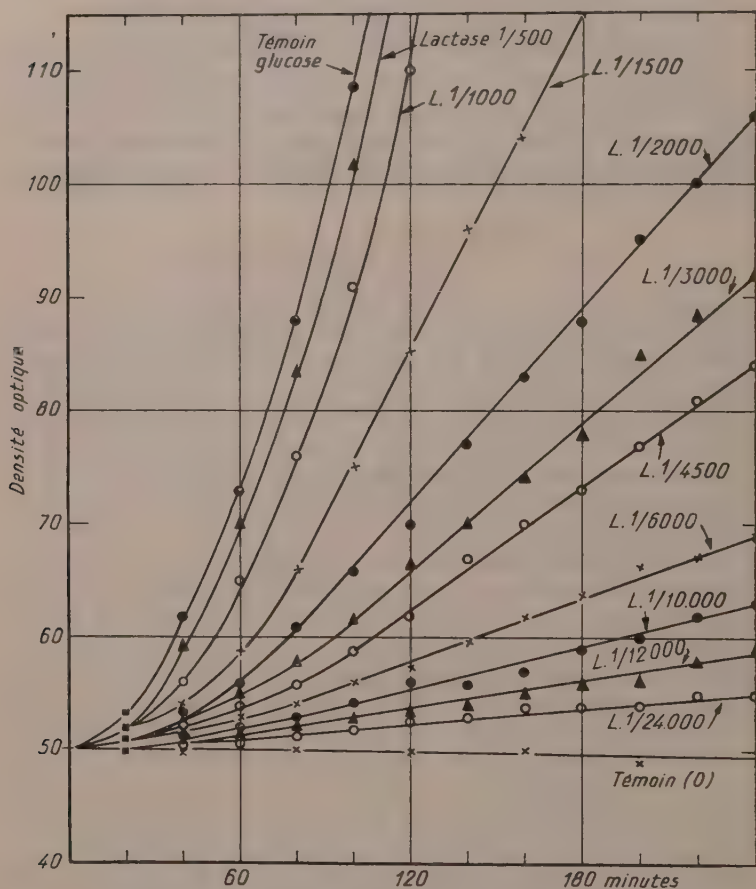


FIG. 1. — Influence du régime carboné sur la croissance de la souche de *Pseudomonas pyocyanea* 13 (8). Une culture carencée en glucose et contenant 5 p. 1 000 de lactose est fractionnée. A chaque échantillon, on ajoute, soit un excès de glucose (témoin), soit différentes dilutions d'une même préparation de β -galactosidase. Les suspensions sont alors agitées à 37°. En ordonnée : la densité optique. En abscisse : le temps en minutes.

l'augmentation de substance bactérienne par unité de temps est également constante. Ainsi, on peut, dans certaines limites, régler la vitesse de croissance par la dilution de l'enzyme. On obtient

à volonté des temps de génération de quatre, huit, quinze, vingt heures, etc. Il est bien évident que, pour obtenir un régime donné, la dilution de β -galactosidase à employer dépend de la concentration des bactéries.

INFLUENCE DU RÉGIME CARBONÉ
SUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN PHAGE VIRULENT.

Le phage P2, isolé d'une eau d'égout, est actif sur les souches 13 et 13 (8). Les mutants bactériens résistants sont rares (10^{-6} à 10^{-7}) et ne sont pas lysogènes. P2 se comporte donc comme un phage virulent. La période latente minima sur les bactéries 13 (8) en milieu synthétique est d'environ vingt-cinq minutes, le rendement unitaire moyen de 50 à 70. P2 forme de grandes plages sur 13 et 13 (8) [3 à 5 mm de diamètre].

On sait depuis longtemps qu'en l'absence d'aliment carboné utilisable, les bactéries ne peuvent assurer le développement des bactériophages. Si, à une suspension de 13 (8) infectée par des phages virulents P2, on ajoute un excès de glucose (voir fig. 2), la densité optique reste stable pendant les vingt-cinq minutes de la période latente et l'intensité respiratoire de la culture mesurée dans l'appareil de Warburg reste égale à ce qu'elle était immédiatement avant l'infection. Ceci est comparable à ce qui a été observé avec les phages T2 ou φ_{11} sur *E. coli* B (Cohen et Anderson, 1946 ; Monod et Wollman, 1947). Après vingt-cinq minutes, les bactéries se lysent en libérant des bactériophages et le rendement unitaire moyen est d'environ 62 phages par bactérie.

Si, à la suspension carencée et infectée, on ajoute du lactose et de la β -galactosidase diluée de manière que le temps de génération des bactéries témoins soit d'environ six heures, l'intensité respiratoire de la suspension est réduite au quart environ de la valeur précédente, mais la durée de la période latente n'est pas modifiée. La durée de la période de lyse est sensiblement étalée, vraisemblablement à cause d'une affinité inégale des bactéries pour le glucose. Le rendement unitaire moyen n'est que faiblement diminué : 52 phages par bactérie.

Si la β -galactosidase est encore plus diluée, de manière que le temps de génération des bactéries témoins soit d'environ douze heures par exemple, la durée de la période latente est augmentée notablement sans que soit beaucoup diminué le rendement moyen (40). Il n'y a pas de relation directe entre la quantité de glucose mis à la disposition des bactéries et la durée de la période latente : si l'on double la dilution de l'enzyme, la durée de la période latente n'est multipliée que par un facteur 1,5 à 1,7.

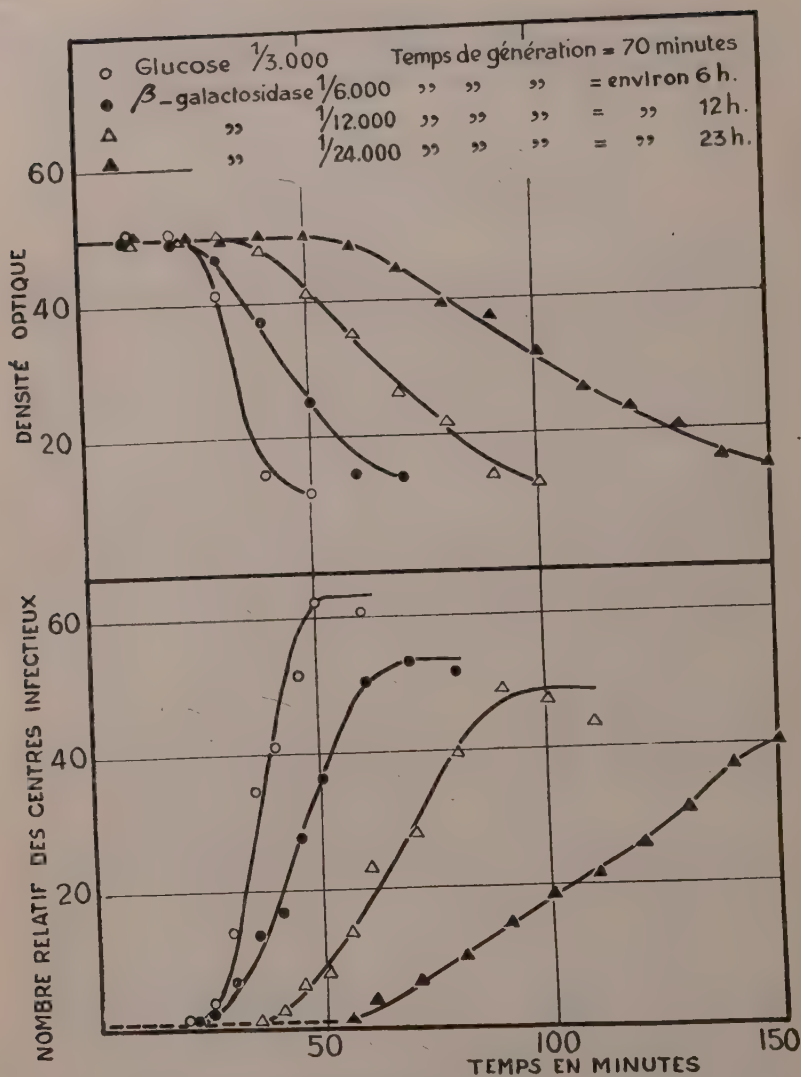


FIG. 2. — Influence du régime carboné sur le développement du bactériophage virulent P2. Une culture de bactéries 13 (8) carencée en glucose et contenant 5 p. 1 000 de lactose est infectée par du phage virulent P2. Après adsorption et élimination des phages libres, la suspension est fractionnée et, à chaque échantillon, on ajoute soit un excès de glucose, soit diverses dilutions d'une même préparation de β -galactosidase (temps 0). Ces cultures sont ensuite agitées à 37°. En ordonnée : en haut, la densité optique; en bas, le nombre relatif des centres infectieux. En abscisse : le temps en minutes.

Pour produire des bactériophages virulents, les bactéries exigent donc des quantités très faibles d'aliment carboné, beaucoup plus faibles que pour la croissance bactérienne, car la diminution progressive du régime carboné limite la vitesse de croissance des bactéries bien avant d'augmenter la durée de la période latente. Lorsque les bactéries infectées disposent d'un excès de glucose, celui-ci est oxydé à la même vitesse après l'infection qu'immédiatement avant, mais une faible partie de ce glucose est utilisée dans les réactions qui conduisent à la synthèse des phages, puisqu'on peut réduire trois ou quatre fois le métabolisme carboné sans autre effet qu'une légère diminution du rendement. C'est seulement si le régime est au moins cinq fois inférieur au régime assurant la croissance bactérienne à taux normal que la synthèse du phage est ralentie.

INFLUENCE DU RÉGIME CARBONÉ SUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN PHAGE TEMPÉRÉ.

Le phage p8, issu d'une souche lysogène de *P. pyocyanea*, est actif sur la souche 13 de la même espèce et donne des clones lysogènes 13(8). Il se comporte donc comme un phage tempéré. La période latente minima, après induction de la souche 13(8) par irradiation, est de quatre-vingts à quatre-vingt-dix minutes en milieu synthétique glucosé, le rendement moyen de 70 à 90. Le phage p8 est très résistant à l'inactivation par les rayons U.V., contrairement à P2. Les plages de p8 sur 13 sont petites (0,5 à 1 mm de diamètre). Il n'y a pas de relation sérologique entre P2 et p8.

Si l'on ajoute un excès de glucose à une suspension de bactéries lysogènes 13(8) irradiées avec une dose de rayons ultraviolets telle que la production de phages soit induite chez 95 p. 100 au moins des bactéries, la densité optique et l'intensité respiratoire de la suspension augmentent pendant les quatre-vingt-dix minutes de la période latente, puis les bactéries se lysent et libèrent environ 80 phages par bactérie (voir fig. 3).

La diminution progressive du régime carboné entraîne une diminution de la croissance bactérienne et du rendement moyen, sans allongement de la durée de la période latente. Quand le régime est tel que le temps de génération des bactéries témoins soit d'environ six heures, la croissance bactérienne est supprimée, l'intensité respiratoire, qui est réduite environ au tiers ou au quart de la valeur initiale, reste constante jusqu'à la lyse, tandis que la durée de la période latente n'est pas sensiblement allongée. Le rendement unitaire moyen est diminué. Avec ce régime, la situation est donc la même pendant le développement des deux

types de phages, contrairement à ce que l'on observe en présence d'un excès de glucose.

Si l'on diminue encore le régime, en augmentant la dilution de

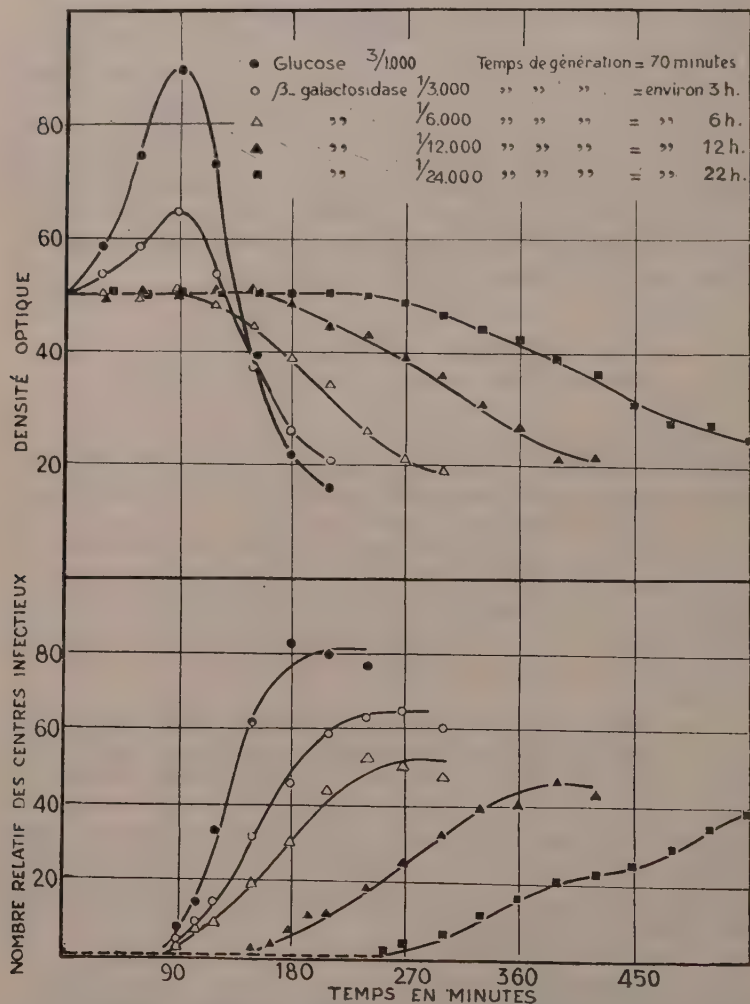


FIG. 3. — Influence du régime carboné sur le développement du bactériophage tempéré *p8*. Une culture de bactéries 13 (8) carencée en glucose et contenant 5 p. 1 000 de lactose est irradiée avec une dose d'U. V. qui induit le développement du phage chez plus de 95 p. 100 des bactéries. La suspension est alors fractionnée et, à chaque échantillon, on ajoute soit un excès de glucose, soit diverses dilutions d'une même préparation de β -galactosidase. Ces cultures sont ensuite agitées à 37°. En ordonnée : en haut, la densité optique ; en bas, le nombre relatif des centres infectieux. En abscisse : le temps en minutes.

l'enzyme, la durée de la période latente est allongée et le rendement unitaire moyen légèrement diminué comme dans le cas du phage virulent.

Ainsi, pendant le développement du phage tempéré, la diminution du régime carboné affecte la croissance résiduelle des bactéries avant de modifier la vitesse de synthèse du phage, mesurée par la durée de la période latente minima. Tout se passe donc comme si, au-dessous d'un certain régime, le glucose disponible était utilisé pour les seules synthèses du phage. Lorsque le régime est plus élevé, mais alors seulement, un surplus de glucose reste disponible pour les synthèses bactériennes. On peut vérifier cette conclusion en ajoutant un excès de glucose, au cours de la période latente, à des bactéries lysogènes irradiées dont le régime a été réglé pour que la croissance bactérienne soit supprimée, sans que la période latente soit notablement allongée. Pendant les soixante-dix à quatre-vingts premières minutes, l'addition de glucose entraîne la reprise immédiate de la croissance bactérienne qui se poursuit jusqu'à la lyse. C'est seulement quand les premiers phages intrabactériens sont formés que l'addition de glucose ne provoque plus de croissance bactérienne.

Ces expériences ont été réalisées après irradiation d'une souche lysogène 13(8). On obtient des résultats analogues en infectant des bactéries sensibles 13 par le même phage p8, mais les expériences sont rendues plus délicates par les difficultés d'adsorption.

QUANTITÉS DE GLUCOSE CONSOMMÉES PAR LES BACTÉRIES PENDANT LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIOPHAGES.

L'alimentation des bactéries par les systèmes lactose + β -galactosidase permet de calculer grossièrement la quantité d'aliment carboné consommée par les bactéries pendant le développement des phages, lorsque le régime devient limitant pour la synthèse des phages. On connaît en effet le débit d de glucose libéré par la dilution choisie de l'enzyme. En admettant que les bactéries consomment tout le glucose libéré, cette quantité de glucose consommé pendant un temps t est le produit $d \times t$. Pour le temps, on a choisi, plutôt que la période latente minima, la durée qui s'écoule entre le moment où l'on ajoute l'enzyme et celui où la moitié des bactéries s'est lysée. Avec la souche 13(8) de *P. pyocyanea*, il faut environ 10^{10} molécules de glucose pour qu'une bactérie double, $6 \cdot 10^8$ molécules de glucose pour qu'une bactérie produise une cinquantaine de phages virulents P2 et $2,6 \cdot 10^9$ molécules de glucose pour qu'une bactérie produise une cinquantaine de phages tempérés p8. Ces résultats ne représentent qu'une moyenne. La valeur trouvée est certainement supérieure

aux besoins réels du système, car avec les grandes dilutions d'enzyme, des quantités plus faibles de glucose permettent encore la production de bactériophages, sans qu'il y ait de relation simple entre le nombre de molécules de glucose consommé et le nombre de phages produits. Les quantités de glucose indiquées sont celles qu'il est nécessaire de fournir aux bactéries pendant la synthèse du phage, mais il est difficile de savoir quelle fraction de la quantité consommée correspond réellement à la synthèse des phages.

INFLUENCE DU RÉGIME AZOTÉ SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIOPHAGES.

Il est possible de limiter la vitesse de croissance des cultures par d'autres facteurs que l'aliment carboné, en particulier par l'azote. Les souches d'*Escherichia coli* n'utilisent généralement pas l'urée comme source d'azote. Le système urée + uréase donne une réaction d'ordre zéro dans des limites assez larges de dilutions de l'enzyme et libère un sel d'ammonium utilisable par les bactéries. On peut ainsi obtenir des croissances linéaires et réglables en ajoutant à une suspension d'*E. coli* K 12, préalablement carencée en azote, un excès d'urée et une même quantité de solutions d'uréase diversement diluées (expériences inédites). En réglant ainsi la quantité d'azote consommée par les bactéries pendant le développement des phages, on obtient des résultats comparables à ceux que l'on observe en faisant varier le régime carboné. En diminuant progressivement le régime azoté pendant le développement du phage λ , on supprime la croissance résiduelle des bactéries, à l'exception d'une brusque augmentation de la densité optique qui précède immédiatement la lyse et qui est vraisemblablement due à un gonflement microbien. Avec des régimes azotés très faibles, on augmente la durée de la période latente pendant le développement du phage T1 ou du phage λ . Toutefois, la diminution du régime azoté semble être plus sévère pour les bactéries que celle du régime carboné car elle affecte plus tôt et plus fortement le rendement moyen en phages.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Les systèmes enzyme-substrat s'avèrent un moyen efficace pour régler l'alimentation des bactéries et modifier leur vitesse de croissance, dans les limites où la réaction est d'ordre zéro. On peut ainsi réaliser très simplement, dans un tube à essai, sur de petits échantillons, des expériences pouvant durer aussi longtemps que le système enzyme-substrat est stable et qu'un autre facteur ne vient pas perturber la croissance.

Les expériences réalisées sur *P. pyocyanea* avec le système lactose + β -galactosidase mettent en évidence une différence importante entre l'action d'un phage virulent et celle d'un phage tempéré sur le métabolisme bactérien. Dans les deux cas, en effet, la consommation du glucose peut être réduite jusqu'à un certain niveau sans autre perturbation dans la multiplication du phage qu'une diminution généralement peu importante du rendement moyen. Dans les deux cas, les régimes carbonés inférieurs à ce niveau deviennent limitants pour la synthèse des phages.

Au contraire, dans les conditions de culture normale, c'est-à-dire lorsque l'aliment carboné n'est pas un facteur limitant, les bactéries consomment un excès de glucose pendant la période latente des deux types de phages. Mais alors que ce surplus de glucose oxydé est utilisable pour certaines synthèses bactériennes pendant le développement du phage tempéré, il est inutilisable pour ces mêmes synthèses pendant le développement du phage virulent. Suivant le type de phage envisagé, l'interférence du développement sur le métabolisme de la bactérie-hôte doit résulter d'un mécanisme différent. En particulier, quoiqu'on ne connaisse pas encore leur action sur le métabolisme bactérien, on sait que les « fantômes » protéiques du phage T2 s'adsorbent et tuent les bactéries sensibles (Herriott, 1951). Il n'en est vraisemblablement pas ainsi pour les phages tempérés, car les phages p8 de *P. pyocyanea* inactivés par les rayons U.V. s'adsorbent sur les bactéries sensibles, mais ne les tuent pas.

Enfin, les résultats des expériences réalisées en faisant varier le régime carboné peuvent vraisemblablement expliquer le fait bien connu que la période latente minima d'un système phage-bactérie donné est sensiblement la même en bouillon et en milieu synthétique minimum, tandis que le taux de croissance des bactéries varie de 3 à 1. On admet qu'en milieu minimum la croissance bactérienne est limitée par la vitesse de synthèse des métabolites essentiels. Il est vraisemblable que la vitesse de synthèse des phages n'est diminuée qu'au-dessous d'un certain niveau de synthèse des métabolites essentiels. Même en milieu minimum, la quantité de ces métabolites formés par la bactérie serait supérieure à ce niveau et suffisante pour permettre la synthèse d'un certain nombre de bactériophages dans le délai minimum correspondant à la période latente minima.

BIBLIOGRAPHIE

- S. S. COHEN et T. F. ANDERSON. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 511.
M. COHN et J. MONOD. *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 153.
R. M. HERRIOTT. *J. Bact.*, 1951, **61**, 752.

- F. JACOB. Ces *Annales*, 1952, **82**, 578.
J. MONOD. Ces *Annales*, 1950, **79**, 390.
J. MONOD et E. WOLLMAN. Ces *Annales*, 1947, **73**, 937.
A. NOVICK et L. SZILARD. *Science*, 1950, **112**, 715-716.
L. SIMINOVITCH. Ces *Annales*, 1953, **84**, 265.

BIOCHEMICAL MODIFICATIONS OF THE BACTERIAL HOST DURING BACTERIOPHAGE DEVELOPMENT (1)

by L. SIMINOVITCH.

(*Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.*)

Up until a few years ago, most of the emphasis in bacteriophage work, particularly in biochemistry, has been centered on one system i. e. the system of the seven T bacteriophages acting on the *E. coli* B host. However, one has to be wary about reaching any general conclusions about bacteriophage reproduction from work with such virulent phages. This has become especially evident after investigation of lysogenic bacteria and the bacteriophages associated with them. This paper will deal with the biochemical modifications which take place in bacteria during bacteriophage development.

The work done with the T or related phages acting on *E. coli* B may first be reviewed briefly. S. S. Cohen and T. F. Anderson first observed that when *E. coli* B is infected with T2 or T4 bacteriophage, growth ceases [1]. The same is true if the phage ϕ_{11} is used [2].

If the oxygen uptake of the infected bacteria is measured, it is found that respiration continues, but that the increase found in growing cells is not observed i.e. the bacteria respire at the rate existing at the time of infection [1]. This indicates that no production of enzymes associated with the respiratory system occurs after infection.

This interference with the normal synthetic processes of the host after bacteriophage infection is shown very strikingly when the adaptive capability of the cell is examined. Monod and Wollman were able to demonstrate that when *E. coli* B grown in glucose is infected with bacteriophage ϕ_{11} , these bacteria could then not adapt to utilise lactose [2]. This result has recently been confirmed in a more demonstrative fashion by Benzer [3], who has

(1) This work has been supported by a grant of the *National Cancer Institute of the National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland.

found that in this latter system, infected bacteria cannot form any β -galactosidase adaptively in presence of the inducing substrate. Moreover, any adaptation taking place is immediately arrested at the time of infection, and the amount of enzyme present in the cell remains unchanged.

The synthesis of ribonucleic acid (RNA) is blocked at infection,

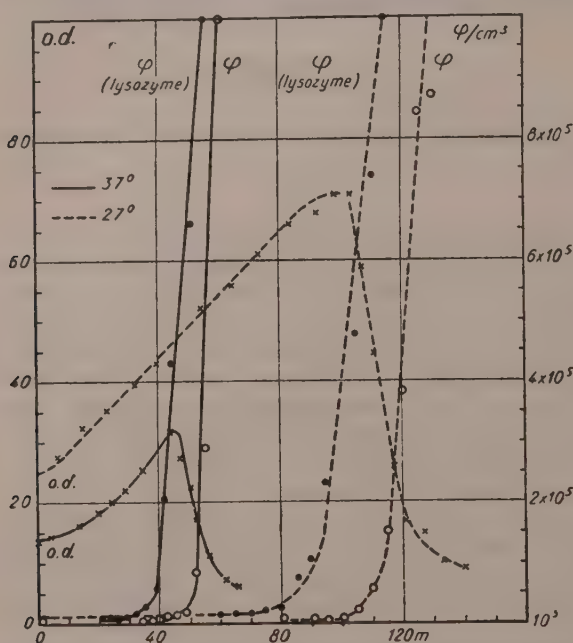


FIG. 1. — Measurement of time elapsed after induction, for lysis and for the appearance of intra and extra cellular bacteriophage at 27° and 37° C in induced *B. megatherium* 899 (1).

Bacteria were grown in a yeast-casein culture medium to 4×10^8 bacteria/ml, and then irradiated with an inducing dose of UV light.

1° Two aliquots were diluted into an equal volume of fresh medium at 27 and 37° C and the optical density followed in an electrophotometer.

2° Two aliquots were heavily diluted into fresh medium. At various times after the irradiation, bacteriophage titrations were made with and without the addition of lysozyme to lyse the cells.

and no increase in quantity is observed throughout the latent period [4]. Desoxyribonucleic acid (DNA) synthesis appears to be blocked for a short time, but, after this negative period, the production of DNA recommences at a rate depending on the phage being studied. With T2, T4, T6, the rate is very rapid [4, 5]. With T3, it is rather slow [6].

As all of this work was done either with the T phages or with ϕ 11, which are known to be very virulent phages, and have been selected for this reason, the question obviously arose as to the generality of the conclusions which could be drawn from these results. That is are all these biochemical modifications a necessary feature of bacteriophage reproduction, irrespective of the type of phage being studied.

In lysogenic bacteria, bacteriophages are propagated through succeeding bacterial generations in a non-infectious form, the so-called prophage (Cf. 7). It has been shown that the development of bacteriophage in certain of these strains may be induced by various agents such as U. V. light, organic peroxides, nitrogen mustard, etc. [8, 9, 10]. In some respects, this induction is similar to the infection of *E. coli* by an exogenous bacteriophage particle. After a definite latent period, mass lysis ensues with liberation of 100-200 bacteriophages. However, as will be shown presently, there are some major differences, particularly biochemically.

One of the first noteworthy characteristics of induced lysogenic bacteria is their continued growth even during phage development. Figure 1 represents a one step growth experiment done with lysogenic *B. megatherium*. This is very similar to a one step growth experiment with the *E. coli* B virulent phage system. No phage is released until lysis and there is a rapid increase of free phage at the end of the latent period. About 10 minutes earlier, the first intracellular bacteriophages can be detected by lysis of the bacteria with lysozyme. It will be seen, however, that these lysogenic bacteria in which phage development has been induced continue to show an increase in optical density until the moment of lysis. This situation is characteristic of all systems studied up to now involving temperate phages whether the development is occurring after induction or after infection [8, 11].

The increase in optical density is not an artefact due to such phenomena as swelling, etc. and corresponds to actual growth and syntheses. This has been shown by further study of the physiological modifications associated with the development of temperate phages [12].

If the respiration of cultures of irradiated lysogenic bacteria is measured, it is found that respiration continues to increase after induction and the curve of oxygen uptake is parallel to the growth curve (fig. 2). This shows evidently that phage development in lysogenic bacteria does not block the synthesis of the system of enzymes involved in the respiration of the bacteria.

A similar result is found if one studies the evolution of ribo-

nucleic acid (RNA) in induced lysogenic bacteria (fig. 3). Here again as the optical density increases, so does the quantity of RNA and the two curves are very nearly parallel. So that in lysogenic bacteria, the increase in optical density observed after induction corresponds to actual syntheses.

This ability can be well illustrated by studying the biosynthesis of a particular enzyme. We have recently, with F. Jacob, studied the power of an induced lysogenic strain of *E. coli* K 12 to form

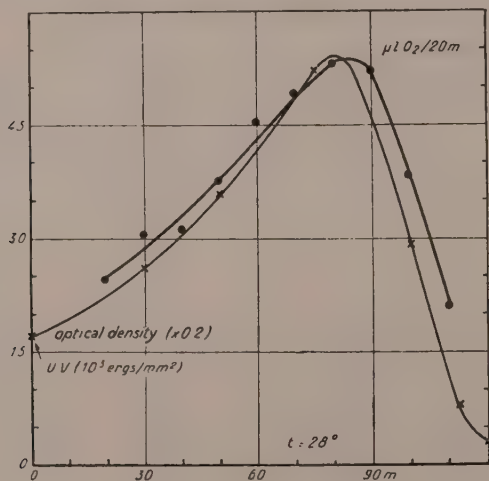


FIG. 2. — Measurement of rate of respiration at 28°C after induction of *B. megatherium* 899 (1).

Bacteria were grown to 5×10^7 bacteria/ml and irradiated with an inducing dose of UV light. The suspension was divided into 11 Warburg flasks which were agitated at 28°C , 5 flasks served for the measurement of oxygen uptake and 6 for optical density measurements.

an adaptive β -galactosidase [13], using maltose as energy source and lactose as enzyme inducer (fig. 4).

If the culture grown on maltose is irradiated with U. V. light, one observes the characteristic residual growth followed by lysis at the 80th minute (curve 1). Bacteriophages appear at about this time and continue to rise as shown (curve 3). Measurement of intrabacterial phage shows that the first particles appear at about the 50th minute (curve 2). If now an inducing sugar is added immediately after irradiation and β -galactosidase measurements made during the latent period, it is found that synthesis of this enzyme does take place as shown on curve B. This synthesis continues throughout the latent period. The addition of lactose

at 20, 40 or 60 minutes after the U. V. irradiation (curves C, D, E) induces the synthesis of the adaptive enzyme.

It should be mentioned that the rate of synthesis of β -galactosidase in the irradiated culture (curve B) is much less than that of the control (curve A), this decrease apparently being due partially to the development of phage, and partially to the effect of U. V. on the synthetic capabilities of the bacterium.

This experiment shows that formation of bacteriophage in

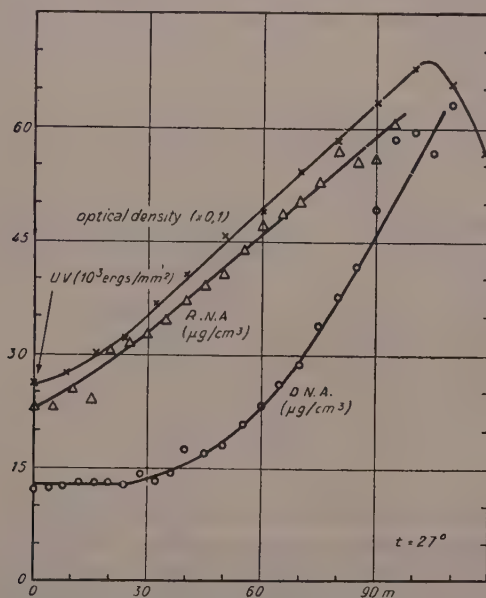


FIG. 3. — The synthesis of ribonucleic acid and desoxyribonucleic acid at 27° C in *B. megatherium* 899 (1) after induction with UV light.

A culture containing 5×10^7 bacteria/ml was irradiated with an inducing dose of UV light. This suspension was then diluted into fresh medium at 27° C and shaken. Samples were taken at suitable intervals for the measurement of optical density, ribonucleic acid and desoxyribonucleic acid (12).

lysogenic bacteria does not preclude the synthesis of an adaptive enzyme. This is in marked contrast with the results shown with the ϕ_{11} phage-*E. coli* system. It may also be pointed out, as J. J. Weigle and M. Delbrück have done, that T5 is capable of reproducing itself in induced K 12 (λ) up until 40-50 minutes of the latent period for development of the temperate phage [14].

Of the biochemical modifications so far discussed, therefore, the consequences of development of the two types of phages temperate and virulent are very unlike each other.

One phenomenon which is, heretofore, common to all systems, is the pattern of desoxyribonucleic acid (DNA) synthesis. As mentioned earlier, infection with a T phage leads to a temporary

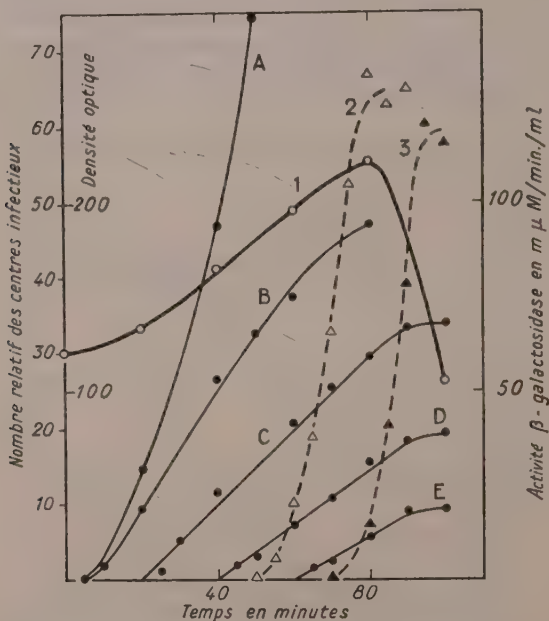


FIG. 4. — Synthesis of β -galactosidase in K 12 (Δ).

Bacteria were cultivated in a synthetic medium containing 3/1 000 of maltose.

1° One fraction of this culture, which served as non irradiated control, was diluted into fresh medium containing 3/1 000 maltose and 2/1 000 lactose. This suspension was shaken at 37° C and the optical density (curve 1) and the β -galactosidase activity (curve A) followed as a function of time.

2° A second aliquot of the culture was irradiated with UV light and diluted into fresh medium containing 3/1 000 maltose. This suspension was shaken in the dark at 37° C. At zero, twenty, forty and sixty minutes samples were taken from the suspension to which were added 2/1 000 of lactose. All these suspensions were shaken at 37° C and samples taken at various times for measurements of β galactosidase activity. Curves B, C, D, E represent the β -galactosidase activities when the lactose was added at zero, twenty, forty or sixty minutes respectively.

3° An aliquot of the irradiated culture was diluted 10^5 times, and placed at 37° C. At various times samples of this suspension were plated on the sensitive strain for measurement of bacteriophage liberated by bacterial lysis (curve 3).

4° An aliquot of the irradiated culture was diluted 10^2 times and shaken at 37° C. At various times samples were diluted 1 : 10 in a M/100 KCN solution and allowed to stand thirty minutes at 37° C. This suspension was then diluted 10^2 times and plated with the sensitive strain to measure the number of intrabacterial bacteriophages (curve 2).

halt in DNA accumulation, followed by synthesis. Working with induced *B. megatherium*, we have found the same general pattern of blockage and resumption of synthesis, as shown in fig. 3. The synthesis of DNA is therefore temporarily blocked in the early part of the latent period, although the bacteria continue to synthesize RNA, respiratory and adaptive enzymes, and to grow.

The early blockage of DNA synthesis after infection with a virulent phage is at first sight another manifestation of the inhibition of most synthetic processes of the host during virulent phage reproduction. The pertinent feature of the DNA kinetics here, is the resumption of synthesis later in the latent period.

In induced lysogenic bacteria, on the other hand, the host is still able to effect syntheses other than the formation of bacteriophage. Although the rapid synthesis of DNA towards the end of the latent period is again observed during the development of temperate phages, the striking feature is that DNA accumulation is blocked during the early part of the latent period. The early arrest in DNA formation assumes here its full significance and may be considered therefore to be a general consequence of bacteriophage reproduction. It is of interest to point out that the blockage is not observed during the synthesis of colicine, a substance which has certain features similar to phage, whose synthesis may be induced, but which apparently does not contain any DNA [15].

The reproduction of virulent phages seem to lead to one series of biochemical modifications and that of temperate phages to another. It should be emphasized too that the difference between virulent and temperate phages is not a function of the bacteria studied, but of the system. For instance K 12 (λ) carries a temperate phage and the induction of the development of the phage in this host will lead to the modifications characteristic of a temperate phage. However, K 12 (λ) is also sensitive to the T phages and its infection with these phages, in the absence of U. V. irradiation, will lead to the biochemical modifications characteristic of the virulent phages.

A similar situation is found with *P. pyocyaneus* where the two types of phages can develop in the same host. The biochemical modifications observed are characteristic of the type of phage whose development is being followed.

In the light of this biochemical work one may speculate on the difference between virulent and temperate phages. Protein coats of certain virulent phage may be obtained, which are still able to absorb to the host and to kill [16]. Although the biochemical modifications associated with the action of coats on bacteria has not been studied, it is conceivable that one of the major differences

between virulent and temperate phages may be related to the action of their respective coats. Most biochemical changes observed in virulent phage infected bacteria would then be due to the « toxic » effect of the coat. In this connection, it may be pointed out that colicine acts like a virulent phage on sensitive bacteria [15].

As far as is known, the coat of temperate phages is devoid of lethal action and as a matter of fact this may be a prerequisite for lysogenization. The only relevant manifestation of the development of bacteriophage would be then the pattern of DNA synthesis, which is similar for both temperate and virulent phages.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. S. COHEN and T. F. ANDERSON. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 511.
- [2] J. MONOD and E. WOLLMAN. *These Annales*, 1947, **73**, 937.
- [3] S. BENZER. *Bioch. Bioph. Acta* (in press).
- [4] S. S. COHEN. *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 281.
- [5] S. S. COHEN and R. ARBOGAST. *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 619.
- [6] A. B. PARDEE. *These Annales*, 1953, **84**, 147.
- [7] A. LWOFF and A. GUTMANN. *These Annales*, 1950, **78**, 711.
- [8] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH and N. KJELDGAARD. *These Annales*, 1950, **79**, 815.
- [9] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2238.
- [10] A. LWOFF and F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2308.
- [11] F. JACOB. *These Annales*, 1952, **82**, 433.
- [12] L. SIMINOVITCH and S. M. RAPKINE. *C. R. Acad. Sci*, 1951, **232**, 1603 ; *Bioch. Bioph. Acta*, 1952, **9**, 478.
- [13] L. SIMINOVITCH and F. JACOB. *These Annales*, 1952, **83**, 745.
- [14] J. J. WEIGLE and M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
- [15] F. JACOB, L. SIMINOVITCH and E. WOLLMAN. *These Annales*, 1952, **83**, 295.
- [16] A. HERSHEY. *These Annales*, 1953, **84**, 99.

INFECTIONS BACTÉRIOPHAGIQUES SECONDAIRES DES BACTÉRIES LYSOGÈNES (1)

par G. BERTANI.

(Department of Bacteriology, University of Illinois,
Urbana, Illinois.)

Les bactéries lysogènes représentent un matériel de choix pour l'étude des problèmes de l'infection et de l'hérédité au niveau cellulaire. Suivant les points de vue, l'on peut considérer une bactérie lysogène comme une cellule infectée ou bien comme une cellule transformée génétiquement.

La cause physique de la différence entre une bactérie lysogène et la bactérie correspondante sensible a été appelée « prophage » (Lwoff et Gutmann, 1950). La nature du prophage et ses relations génétiques et physiologiques avec la cellule qui l'entretient sont donc les problèmes fondamentaux de l'étude des bactéries lysogènes.

Nous avons essayé d'attaquer ces problèmes en étudiant les interactions qui peuvent être décelées entre le prophage d'une cellule lysogène et d'autres phages, apparentés ou non, introduits secondairement dans le système, c'est-à-dire en étudiant des cas d'infection secondaire des bactéries lysogènes.

Les bactériophages employés dans ces études sont les types P1 et P2, précédemment décrits (Bertani, 1951). Tous deux attaquent une souche de *Shigella dysenteriae*, nommée Sh. Tous les deux sont des phages tempérés, c'est-à-dire qu'ils peuvent former des complexes lysogènes avec les bactéries attaquées. On a isolé de nombreux mutants de ces phages. Ceux-ci peuvent être assemblés en deux groupes. Le premier renferme des mutants qui sont différents du phage original seulement par la morphologie des plages ; c'est le cas des mutants rd, rd l et rd hz (*round*, *round large* et *round hazy*) du phage P2 (2). Le second groupe renferme des

(1) Travail effectué grâce à une subvention de l'American Cancer Society (recommended by the Committee on Growth).

(2) Les mutations l et hz ont été obtenues seulement à partir d'une souche de rd. On ne sait pas encore s'il s'agit de facteurs alléomorphes de rd ou bien de mutations en d'autres loci.

mutants qui ont perdu la capacité de former des complexes lysogènes. Ceux-ci donnent toujours des plages complètement claires et sont appelés virulents (vir). On a isolé des mutants virulents de P1 aussi bien que de P2 ; on verra plus loin quel est le critère qui permet de séparer les différents mutants virulents.

LYSOGÉNISATION.

Tandis que les phages virulents lysent la totalité des bactéries sensibles qui ont été infectées (cas par exemple des phages de la série T1-T7), les phages tempérés, eux, ne lysent qu'une partie de la population sensible. La proportion de bactéries qui se lyse semble être déterminée en grande partie par les conditions physiologiques des bactéries. Par exemple, en exposant à la température de 25° C des bactéries Sh qui ont adsorbé du phage P1, on trouve que la proportion des bactéries qui se lysent, produisant du phage, est quatre à cinq fois plus petite que lorsque les mêmes bactéries infectées sont maintenues à 37° C.

Les bactéries qui ne se lysent pas continuent à se multiplier, bien qu'elles aient adsorbé des phages : elle forment des colonies qui contiennent un nombre variable de bactéries lysogènes. Les autres microbes qui constituent ces colonies sont sensibles au phage et ne montrent aucune trace de la présence du phage qui avait été adsorbé par les cellules-mères des colonies. La présence de bactéries sensibles à côté des bactéries lysogènes explique les colonies « mangées » qui peuvent être observées parfois parmi les colonies survivant à l'infection par un phage tempéré.

Par sélection des colonies survivant à l'infection par un phage tempéré, on peut aisément obtenir des souches lysogènes, symbolisées de la façon suivante : Sh(P1), Sh(P2), Sh(P2 rd), etc. Ces souches sont des souches lysogènes typiques. Elles produisent du phage en quantité proportionnelle au nombre des bactéries et à peu près constante dans des conditions constantes de culture, par la lyse d'un petit nombre de germes. Le nombre des phages libérés par chacun des microbes qui se lysent est à peu près égal au nombre qui aurait été libéré par une bactérie sensible, infectée lytiquement. La condition lysogène de ces souches n'empêche pas les bactéries d'adsorber le phage homologue : toutefois, elles sont maintenant « résistantes », c'est-à-dire que le phage homologue (ou un mutant affectant la forme de plage de celui-ci), adsorbé par une cellule lysogène, ne la lyse pas et ne la tue pas. Par exemple, les bactéries Sh(P2) sont résistantes à P2 et aussi à P2 rd, P2 rd 1 et P2 rd hz. D'ailleurs, certaines bactéries lysogènes peuvent montrer d'autres phénomènes de résistance spécifique induite par la présence du prophage. Par

exemple, tandis que Sh est complètement sensible aux phages de la série T, toutes les souches de Sh(P2) examinées se sont montrées résistantes aux phages T2, T4, T5 et T6. Dans ce cas aussi, on n'observe aucun changement de la capacité d'adsorber les phages en question. Un autre exemple est celui de Sh(P1) qui est résistant à P2, tandis que Sh(P2) est sensible à P1.

SOUCHES DOUBLEMENT LYSOGÈNES.

Sh(P2) se comporte donc envers P1 exactement comme Sh. Ainsi, en sélectionnant des colonies formées par des bactéries Sh(P2) qui ont survécu à une infection par P1, on peut isoler très aisément des souches doublement lysogènes, Sh(P2)(P1). Ces souches sont aussi stables que les souches lysogènes pour un seul phage ; elles produisent les deux phages en quantité proportionnelle au nombre de bactéries dans la culture, mais, comme dans le cas précédemment étudié d'une bactérie naturellement lysogène pour trois phages différents (Bertani, 1951), lorsqu'une cellule de Sh(P2)(P1) libère du phage, celui-ci est d'un seul type, ou P2 ou P1. Au niveau cellulaire il n'y a pas de libération mixte des deux types de phage, qui cependant doivent être présents dans chaque bactérie à l'état de prophage. Le mécanisme de cette exclusion n'est pas connu. Le fait qu'il y a exclusion complète (au sens de Delbrück et Luria, 1942, et Delbrück, 1945) entre les formes virulentes de P1 et P2 lorsqu'elles infectent la même cellule suggère la possibilité qu'il s'agit ici du même mécanisme.

SUBSTITUTION DU PROPHAGE.

Tandis que l'on obtient très aisément des souches doublement lysogènes pour deux « espèces » de phage, il est rarement possible d'obtenir des souches doublement lysogènes pour deux phages tempérés de la même « espèce », différents l'un de l'autre seulement par une ou peu de mutations. On a essayé, sans succès en général, d'obtenir de telles souches en infectant des cultures de Sh(P2) avec du phage P2 rd, ou P2 rd l, ou P2 rd hz, et aussi, réciproquement, des cultures de Sh(P2 rd), ou Sh(P2 rd l), ou Sh(P2 rd hz) avec du phage P2. Ces expériences ont toutefois fourni des informations qui peuvent donner des éclaircissements sur le sort du phage homologue adsorbé par des bactéries lysogènes.

Si l'on infecte la totalité des bactéries d'une culture lysogène, par exemple Sh(P2), avec un phage tempéré qui diffère du phage perpétué sous forme de prophage par une mutation seulement, par exemple P2 rd, on n'observe aucun effet apparent sur les

bactéries. Il n'y a pas de lyse, pas de cellules tuées. Les bactéries continuent à se multiplier et à produire du phage comme avant l'infection. Toutefois, les phages libérés après l'infection ne sont pas tous du type qui était perpétué sous forme de prophage, mais sont en partie du type qui a servi à l'infection secondaire (à peu près 4 p. 100 dans le cas d'une infection secondaire de 10 phages par cellule). En général ce phage du type nouveau n'est pas produit par des bactéries doublement lysogènes, Sh(P2)(P2 rd), mais par des germes qui sont devenus tout simplement lysogènes pour le nouveau phage, P2 rd, et ont perdu le prophage P2. Cela peut être démontré en étalant des bactéries d'une telle culture, une dizaine de générations après le moment de l'infection secondaire, et en analysant les colonies formées par ces cellules pour le type de phage qu'elles produisent. L'on trouve que la plus grande partie de ces colonies produisent seulement P2, tandis qu'une petite portion d'entre elles produit seulement P2 rd. Le pourcentage des colonies qui produisent seulement P2 rd est égal au pourcentage de P2 rd produit par la population au moment de l'étalement. On doit donc conclure que dans certaines cellules une substitution de prophage a eu lieu. Cette substitution ne s'accomplit pas immédiatement après l'infection secondaire ; cela est démontré par le fait que pendant un certain temps après cette infection on peut observer de nombreux cas de cellules qui, en se lysant, libèrent les deux types de phage. Théoriquement, les cellules de la culture de Sh(P2) infectée secondairement par P2 rd pourraient être considérées, pendant cette période de temps (avant la substitution), comme des cellules instables doublement lysogènes, Sh(P2)(P2 rd). Cette condition ne durerait en général que peu de générations, après quoi l'un ou l'autre des deux prophages est perdu.

Dans un seul cas on a isolé, au cours d'une expérience semblable, une souche doublement lysogène stable, Sh(P2)(P2 rd 1). Cette souche produit les deux phages dans un rapport de 1 : 1 ; dans ce cas il n'y a pas d'exclusion mutuelle, c'est-à-dire que lorsqu'une cellule libère du phage, les deux types sont libérés ensemble. On n'a pas encore étudié les facteurs qui conditionnent la formation de telles souches.

INFECTION SECONDAIRE DE CELLULES LYSOGÈNES PAR DES PHAGES VIRULENTS.

Une situation très semblable — *mutatis mutandis* — peut être observée dans le cas de cultures lysogènes infectées secondairement par certains mutants virulents qui ne tuent pas les bactéries lysogènes entretenant un phage homologue tempéré. Une culture

de Sh(P2), infectée secondairement par un mutant virulent de P2 de ce type, continue à se multiplier normalement et l'on trouve que, pendant un certain temps après l'infection, les deux types de phage, P2 et P2 vir, sont produits. Pendant cette période la production du type virulent s'accroît graduellement, atteint un maximum, diminue et enfin cesse. La quantité totale de phage du type virulent produite est plus de deux mille fois plus grande que la quantité de phage introduite au moment de l'infection secondaire ; d'autre part, on sait qu'une bactérie, en se lysant, ne produit pas plus de 300 phages ; on doit donc conclure que dans les germes lysogènes le phage virulent s'est multiplié plusieurs fois sans les lyser, contrairement à ce que l'on observe quand des microbes sensibles sont infectés avec du phage virulent. La cessation de la production du type virulent pourrait être causée par la substitution de P2 par P2 vir dans certaines bactéries, suivie de la lyse de ces bactéries, car le phage P2 vir ne peut pas rester dans la condition lysogène par lui-même. Cette interprétation est confirmée par ce fait : tandis que les bactéries qui se lysent pendant les 5 ou 6 premières générations après l'infection secondaire peuvent libérer ensemble P2 et P2 vir, les bactéries qui se lysent plus tard (avant la disparition complète du type virulent) libèrent ou l'un ou l'autre type de phage, mais jamais les deux types ensemble.

D'autres faits intéressants peuvent être observés après l'infection secondaire de bactéries lysogènes par ces mutants virulents. Si l'on infecte secondairement une culture de Sh(P2 rd+) avec P2 + vir, et que l'on étudie les types de phages libérés à des temps divers après l'infection, on peut démontrer qu'il y a recombinaison génétique entre P2 rd + et P2 + vir : on obtient, en effet, les types P2 rd vir et P2+ +. Ceux-ci commencent à apparaître une ou deux générations après l'infection secondaire. Lorsqu'ils apparaissent, ils sont dans le rapport 1:1, comme on doit s'y attendre s'il s'agit d'un mécanisme d'échange génétique. Plus tard, c'est-à-dire après un plus grand nombre de générations, le type P2 rd vir devient beaucoup plus abondant que P2+ +, d'une façon parallèle à la production du parent virulent, décrite ci-dessus. Comme dans le cas du parent virulent, dans les dernières générations, avant la disparition des types virulents, on observe des bactéries qui libèrent seulement des phages du type P2 rd vir.

Tous les mutants virulents ne se comportent pas de la même façon. On peut établir toute une échelle de types virulents. Les premiers sont les types décrits ci-dessus. On pourrait les appeler virulents faibles. A l'autre extrême on trouve les virulents forts. Ceux-ci lysent non seulement la totalité des cellules de Sh qu'ils infectent, mais aussi les cellules lysogènes Sh(P2) : la présence

du prophage P2 n'a aucun effet sur la multiplication du phage virulent. Enfin, il y a des mutants virulents intermédiaires qui peuvent former des plages sur Sh(P2), mais en nombre plus petit que sur Sh. Ces mutants n'ont pas encore été étudiés en détail.

DISCUSSION ET RÉSUMÉ.

Le prophage est, par définition, doué de continuité génétique (Burnet et McKie, 1929 ; Lwoff et Gutmann, 1950). On peut envisager deux mécanismes divers qui pourraient assurer cette continuité.

a) Le prophage est présent en de nombreux exemplaires identiques dans chaque bactérie lysogène ; chacun se multiplie — en moyenne — chaque fois que la bactérie se multiplie ; au moment de la division microbienne, les prophages sont répartis entre les deux bactéries-filles. Dans ce cas la continuité génétique de la condition lysogène serait d'origine statistique. Si le nombre des prophages est trop petit ou si le partage des prophages au moment de la division cellulaire ne se fait pas au hasard, il deviendrait relativement facile d'obtenir des bactéries qui ont perdu le prophage et sont ainsi devenues sensibles. Etant donné que ce cas est fort rare dans les conditions normales de culture, on devrait conclure que le nombre de prophages par bactérie est relativement élevé.

b) Il y a seulement un prophage par bactérie ou par noyau : il se multiplie et il est transmis aux bactéries-filles par un mécanisme régulier synchronisé avec la division microbienne ou la division nucléaire. On peut concrétiser cette hypothèse en imaginant, par exemple, que le prophage se comporte comme s'il était un chromosome — ou un morceau de chromosome — bactérien. Selon cette hypothèse, la perte du prophage serait quelque chose de comparable à une mutation génique ou chromosomique.

L'infection secondaire d'une bactérie lysogène par un phage tempéré a montré qu'il pouvait y avoir substitution du prophage original par un autre. Ce phénomène est beaucoup plus facilement explicable avec la seconde hypothèse ci-dessus qu'avec la première. Si cette dernière était correcte, on pourrait s'attendre à ce que des bactéries entretenant deux types apparentés de prophage donnent occasionnellement une bactérie-fille ayant seulement un type de prophage. Si le nombre des prophages était relativement élevé, un tel événement serait beaucoup plus rare qu'il ne l'est en réalité. Il faudrait alors admettre que le partage des prophages ne se fait pas au hasard, ou alors qu'il y a des phénomènes de compétition physiologique amenant l'exclusion de l'un ou de l'autre des prophages apparentés. Or de tels phénomènes n'ont

jamais été observés chez des phages virulents, malgré le grand nombre d'expériences qui ont été faites sur les infections mixtes (Hershey, 1946 ; Hershey et Rotman, 1949).

L'hypothèse d'un seul prophage nucléaire est du reste rendue vraisemblable par des expériences de croisement de bactéries lysogènes avec des bactéries sensibles faites par E. M. Lederberg (1951). Si ce point de vue est exact, la souche doublement lysogène de Sh(P2)(P2 rd 1) peut être envisagée comme une souche diploïde hétérozygote pour les deux phages qu'elle perpétue, ou comme le résultat d'une duplication du morceau de chromosome portant le prophage. Des recherches en cours pourront peut-être permettre de confirmer l'une ou l'autre de ces interprétations.

Il n'est pas possible, pour l'instant, de tirer des conclusions générales des autres résultats expérimentaux décrits plus haut. Toutefois, il n'est peut-être pas inutile de donner quelques conclusions partielles qui concernent d'autres aspects du problème de la lysogenèse.

L'effet de la température sur la proportion des germes Sh qui se lysent après infection avec P1 est incompatible avec l'hypothèse de Boyd (1952) selon laquelle les préparations de phages tempérés seraient des populations mixtes de phages qui lysent la bactérie-hôte et de mutants qui, au contraire, forment des complexes lysogènes avec les bactéries qu'ils infectent.

Les expériences d'infection secondaire de bactéries lysogènes par des phages apparentés au prophage démontrent que le phage introduit secondairement peut se multiplier, au moins pendant un certain temps. Cette multiplication aboutit parfois à une ségrégation de types. Le mécanisme de ces phénomènes nous échappe pour le moment.

La recombinaison génétique entre un phage perpétué sous forme de prophage et un phage introduit secondairement, suivie de multiplication différentielle d'un des recombinants, peut être considérée comme une démonstration du fait que la recombinaison n'est pas un processus « terminal » qui précède immédiatement la maturation du phage et, par conséquent, la lyse de la bactérie.

Les interactions observées entre phages apparentés dans les cas d'infection secondaire d'une bactérie lysogène sont intéressantes aussi d'un point de vue comparatif. On connaît beaucoup d'exemples de plantes qui peuvent « guérir » après infection par un virus pathogène. Parfois ces plantes « guéries » sont résistantes à des réinfections par le même virus ou par des virus apparentés au premier. Dans la plupart des cas, ces plantes « guéries » continuent à produire du virus, bien qu'en moindre quantité que dans la période qui suit immédiatement la première infection. Il est possible que, comme chez les bactéries lysogènes, l'immu-

nité soit liée à la présence d'un provirus. Le développement du provirus en virus ne se produirait que dans une proportion restreinte de cellules et la condition des plantes guéries serait comparable à celle des bactéries lysogènes.

Quoi qu'il en soit, il est peut-être raisonnable de considérer le cycle lysogène : adsorption, conversion du phage en prophage et perpétuation du prophage, avec développement occasionnel du prophage en phage dans quelques bactéries qui se lyseront, comme le cas le plus général de la multiplication du bactériophage. On sait qu'il est facile de sélectionner des mutants virulents des phages tempérés (Burnet et Lush, 1936 ; Boyd, 1951). Le cycle lytique : adsorption, multiplication, maturation du phage et lyse de la bactérie infectée, qui a été surtout étudié jusqu'ici, ne représente donc peut-être qu'un cas particulier du cycle lysogène du bactériophage.

L'auteur désire exprimer sa reconnaissance à M^{lle} S. J. Nice pour sa collaboration ; à M. et M^{me} J. et E. Lederberg, à M^{lle} M. Lieb et M. J. J. Weigle, qui, travaillant aussi sur les bactéries lysogènes, ont consenti un échange continuuel d'informations : tout particulièrement à M. Weigle pour ses conseils pendant la rédaction de ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- G. BERTANI. *J. Bact.*, 1951, **62**, 293-300.
J. S. K. BOYD. *Nature*, 1951, **168**, 994-995 ; *J. Path. a. Bact.*, **58**, 445.
J. S. K. BOYD. *Soc. gén. Microbiol.*, 1952 (à l'impression).
F. M. BURNET et D. LUSH. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 1936, **14**, 27-38.
F. M. BURNET et M. McKIE. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 1929, **6**, 277-284.
M. DELBRÜCK et S. E. LURIA. *Arch. Biochem.*, 1942, **1**, 111-135.
M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1945, **50**, 151-170.
A. D. HERSHEY. *Genetics*, 1946, **31**, 620-640.
A. D. HERSHEY et R. ROTMAN. *Genetics*, 1949, **34**, 44-71.
E. M. LEDERBERG. *Records Genetics Soc. Am.*, 1951, **20**, 108.
A. LWOFF et A. GUTMANN. *Ces Annales*, 1950, **79**, 815-859.

SUR LE DETERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA LYSOGÉNIE (*)

par E. L. WOLLMAN.

(Institut Pasteur. Service de Physiologie microbienne.)

INTRODUCTION.

Chaque bactérie d'une souche lysogène transmet à sa descendance la capacité de produire des bactériophages. Dans une population lysogène, cependant, une faible fraction seulement des bactéries libère spontanément des bactériophages, les autres n'en contenant pas sous forme décelable.

Lorsqu'une souche sensible est mise en présence d'un bactériophage tempéré, une certaine fraction des bactéries survit, et certaines d'entre elles sont à l'origine de colonies lysogènes. Une fois établie, la lysogénie se comporte comme un caractère héréditaire stable. Il s'agit donc, à proprement parler, d'un caractère héréditaire acquis par infection [1].

C'est à la forme inapparente sous laquelle le bactériophage est perpétué dans les bactéries lysogènes que Lwoff et Gutmann [2] ont donné le nom de *prophage*.

Comment le prophage est-il intégré au matériel héréditaire de la bactérie lysogène ? Quelles sont ses relations avec les autres déterminants génétiques de la bactérie ? Seule, l'analyse génétique semblait devoir permettre l'étude de ces problèmes.

Il a été découvert par E. Lederberg [3] que la souche d'*Escherichia coli* K₁₂, chez laquelle a été démontré le phénomène de recombinaison génétique chez les bactéries [4], est lysogène. La souche sauvage, ainsi que la plupart des mutants qui ont été obtenus à partir de cette souche, produisent un bactériophage tempéré, λ . Exceptionnellement, des mutants sensibles à λ ont pu être isolés [3].

Cette découverte soulevait incidemment la question des rapports pouvant exister entre recombinaison et lysogénie. Il ne semble pas que la lysogénie joue un rôle important dans le phénomène

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National cancer Institute of the National Institutes of Health*, des Etats-Unis d'Amérique.

de recombinaison génétique chez *E. coli* K₁₂ : de même qu'on peut croiser deux souches lysogènes, on peut aussi croiser deux souches non lysogènes. Il n'a pu, d'autre part, être jusqu'ici démontré que la lysogénisation par λ s'accompagne du transfert de caractères génétiques [5].

La possibilité de croiser des souches lysogènes avec des souches sensibles permettait d'aborder l'étude du déterminisme héréditaire de la lysogénie. Ce sont les résultats de telles expériences qui font l'objet du présent exposé. Ces résultats sont en accord avec les résultats indépendamment obtenus par E. et J. Lederberg (1) au cours d'une étude beaucoup plus complète du déterminisme de la lysogénie chez *E. coli* K₁₂ [6].

HYPOTHÈSES PRÉLIMINAIRES.

A la lumière des propriétés connues des souches lysogènes, il est possible d'émettre quelques hypothèses simples quant à la nature génétique du prophage et au déterminisme de la lysogénie. Ces hypothèses une fois formulées, il sera possible d'examiner quels résultats expérimentaux seraient en accord avec chacune d'elles.

Il est évident qu'aussi bien les hypothèses que les prévisions qui peuvent en être inférées doivent être simplifiées autant que possible, et qu'on ne saurait trop insister sur la valeur toute relative de termes tels que : facteurs nucléaires ou cytoplasmiques, chromosomes, gènes..., lorsqu'ils sont appliqués à des bactéries.

HYPOTHÈSES CONCERNANT LE PROPHAGE. — *Le prophage est un plasmagène, c'est-à-dire, dans le cas le plus général, une particule cytoplasmique existant dans chaque bactérie en un nombre variable et relativement élevé d'exemplaires, et dont la distribution se fait au hasard lors de la division bactérienne (fig. 1 a).* En effet, si le nombre de prophages par bactérie était faible, la guérison spontanée, phénomène extrêmement rare, devrait être plus fréquemment observée. Si la distribution ne se faisait pas au hasard, ce cas ne serait pas distinct du suivant.

Le prophage est une unité indépendante, dont la duplication est synchrone de celle du matériel génétique de la bactérie, et qui est distribuée exactement, à chaque division, entre les bactéries filles (fig. 1 b).

Le prophage est l'équivalent d'un gène, c'est-à-dire qu'il est intimement lié au matériel génétique de la bactérie, dont il est solidaire au cours de la duplication (fig. 1 c).

(1) Nous tenons à remercier E. et J. Lederberg d'avoir eu l'obligeance de nous communiquer le manuscrit de leur travail.

HYPOTHÈSE CONCERNANT LA LYSOGÉNIE. — Il importe de souligner que les notions de *prophage* et de *lysogénie* sont distinctes. Le prophage est conçu comme étant le support matériel de la continuité génétique du bactériophage dans les bactéries lysogènes. La lysogénie est la possibilité, pour des bactéries contenant le prophage, de produire des bactériophages. Les croisements entre bactéries lysogènes et sensibles ne peuvent donner d'indication que sur le déterminisme de la lysogénie.

Il se peut que la présence du prophage suffise pour que puisse s'exprimer le caractère lysogène : ce que l'on observerait dans

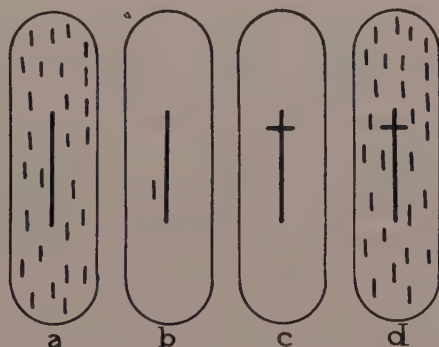


FIG. 1. — Représentations schématiques de l'état du prophage dans les bactéries lysogènes, et du déterminisme de la lysogénie. *a*, Le prophage est un ensemble de particules cytoplasmiques; *b*, Le prophage est une unité "nucléaire" indépendante; *c*, Le prophage est un gène; *d*, Le prophage est un ensemble de particules cytoplasmiques, dont le maintien est conditionné par un gène.

ce cas, c'est la possibilité, pour le prophage lui-même, de ségréger.

Il est également possible que la présence du prophage soit nécessaire, mais non suffisante, pour qu'une souche soit reconnue lysogène, l'expression de la lysogénie étant sous le contrôle de facteurs bactériens : les recombinants détectés comme lysogènes seront ceux qui auront à la fois le prophage et les facteurs bactériens.

Le prophage suffit à l'expression du caractère lysogène. — On pourra, des résultats des croisements entre bactéries lysogènes et bactéries sensibles, tirer des conclusions quant à la situation du prophage selon les schémas *a*, *b* et *c* de la figure 1.

Selon le schéma *a*, tous les recombinants doivent être lysogènes.

Selon le schéma *b*, le caractère lysogène doit ségréger, mais

sans liens apparents avec les autres déterminants génétiques de la bactérie.

Selon le schéma *c*, la lysogénie doit ségréger en liaison plus ou moins étroite avec les autres déterminants génétiques.

L'expression de la lysogénie est contrôlée par des facteurs bactériens. — Les schémas *a*, *b* et *c* de la figure 1 sont encore valables en ce qui concerne le prophage lui-même, mais des hypothèses complémentaires doivent être faites pour définir les relations des facteurs bactériens avec le prophage.

Selon le modèle le plus simple, le seul que nous considérerons ici et qui semble avoir été vérifié dans le cas comparable du facteur *k* chez les paramécies [7], le prophage est un ensemble de particules cytoplasmiques, dont le maintien est conditionné par la présence d'un gène (fig. 1 *d*).

Cette hypothèse, de prime abord la plus attrayante, rendrait compte du fait d'observation courante, qu'une faible fraction seulement des bactéries sensibles mises en contact avec un bactériophage tempéré devient lysogène.

Selon cette hypothèse, la ségrégation de la lysogénie dans les croisements exprimerait la ségrégation du déterminant bactérien sans permettre de conclure quant à la nature du prophage lui-même.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Les techniques généralement utilisées [8] dans les expériences de recombinaison génétique chez *E. coli* K₁₂ n'ont pas à être décrites ici. Il ne sera fait mention que des renseignements utiles à la compréhension des résultats.

SOUCHES. — *Souche sensible* : c'est la souche 112-12 qui a surtout été utilisée dans les croisements. Elle est : C⁻, H⁻, Gal⁻, T₁r (2). Elle provient (après traitement par le rayonnement U. V.) de la souche K₁₂S (obtenue de J. J. Weigle), qui est elle-même une souche sensible issue de *E. coli* K₁₂ sauvage.

Souches lysogènes : ont été particulièrement utilisées les souches suivantes [5] : W₁, qui est B₁⁻ T⁻ L⁻ Mal⁻ Lac⁻.

W₆₇₇ qui est B₁⁻ T⁻ L⁻ Xyl⁻ Mann⁻ Mal⁻ Lac⁻ Gal⁻ (2).

Les abréviations ont les significations suivantes :

Incapacité à croître en l'absence de thiamine (B₁⁻), thréonine (T⁻), leucine (L⁻), cystéine (C⁻), histidine (H⁻).

Ne faisant pas fermenter : le galactose (Gal⁻), le maltose (Mal⁻), le lactose (Lac⁻), le xylose (Xyl⁻), le mannitol (Mann⁻).

Résistance au bactériophage T₁ (T₁r).

(2) Le caractère Gal⁻ de la souche W₆₇₇ est le Gal₃⁻, celui de la souche 112-12 est vraisemblablement le Gal₄⁻ [6].

D'autres souches ont également été utilisées, elles seront mentionnées dans le cours de l'exposé.

Souche indicatrice : c'est la souche C (*E. coli* souche 122 de la National collection of type cultures de Londres) qui a été généralement utilisée comme indicatrice du bactériophage tempéré λ .

TECHNIQUES. — *Croisements* : Pour les croisements entre souches lysogènes et souches sensibles, il importe de laver soigneusement les cultures du parent lysogène avant le mélange, afin d'éliminer le bactériophage λ libre — ou de neutraliser celui-ci par du sérum antibactériophage.

Analyse des caractères des recombinants (3) : chaque recombinant est d'abord réisolé sur milieu synthétique gélosé, additionné de glucose, puis une goutte d'une suspension diluée de ce recombinant est déposée à la surface d'une boîte de Petri contenant du milieu synthétique gélosé additionné du glucide convenable. C'est l'utilisation de ce glucide pour la croissance qui est appréciée. Cette méthode permet de distinguer deux localisations du caractère galactose : le caractère Gal— de la souche 112-12 ne permet aucune croissance sur milieu synthétique gélosé additionné de galactose, tandis que le caractère Gal— de la souche W₆₇₇ permet une croissance appréciable sur ce milieu. Dans les croisements entre 112-12 et W₆₇₇, cette dernière souche peut donc être considérée comme étant Gal+ (voir note 2).

Une technique simple permet de déterminer le caractère lysogène ou non lysogène d'un recombinant : une goutte de suspension bactérienne est déposée à la surface de chacune de deux boîtes de milieu peptoné gélosé ensemencées avec la souche indicatrice C. Une boîte sert de témoin. L'autre reçoit une faible dose de lumière ultra-violette. Si le recombinant est lysogène, on observe des plages isolées sur la boîte témoin, et une zone de lyse sur la boîte irradiée.

La sensibilité ou la résistance à λ des recombinants non lysogènes est déterminée en déposant une goutte d'un filtrat de λ obtenu par induction de K₁₂ (λ) à la surface d'une boîte ensemencée avec le recombinant à tester.

CROISEMENTS ENTRE SOUCHES LYSOGÈNES ET SOUCHES SENSIBLES.

Les croisements entre bactéries lysogènes ne donnent que des recombinants lysogènes. De même, en croisant des bactéries sensibles, on n'obtient que des recombinants sensibles.

Quel que soit le facteur responsable de la lysogénie, qu'il soit « cytoplasmique » (fig. 1 a) ou « nucléaire » (fig. 1 b, c et d), ce sont les croisements entre bactéries lysogènes et bactéries sensibles qui sont susceptibles de fournir une indication à ce sujet.

(3) Le terme *marqueur* sera, dans la suite de cet exposé, réservé aux caractères des souches parentes non sélectionnés dans un croisement.

Les résultats d'un tel croisement entre la souche W_1 , lysogène, et la souche 112-12, sensible, sont rapportés dans le tableau I et peuvent être résumés de la manière suivante :

1° Parmi les recombinants isolés, les uns sont lysogènes, d'autres non lysogènes.

2° La majorité des recombinants (94 p. 100) sont lysogènes.

3° A une exception près (d'ailleurs douteuse), tous les recombinants lysogènes ont le marqueur galactose du parent lysogène. Les autres marqueurs de ce parent sont moins fréquemment associés au caractère lysogène.

4° Tous les recombinants non lysogènes ont le marqueur galactose du parent sensible.

TABLEAU I. — Croisement entre la souche W_1 , lysogène et la souche 112-12 sensible à λ .

<u>PARENTS</u>																		Total	
} 112-12 :		$B_1^- Gal_4^+ Mal_1^-(C^+H^+) Lac_1^- T_1 s(T^-L^-) (F^-)$																	
		$B_1^- Gal_4^- Mal_1^-(C^+H^-) Lac_1^+ T_1 r(T^+L^+) (F^+)$																	
<u>RECOMBINANTS</u>		$(T^+L^+C^+H^+)$																Total	
		Gal	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
		Mal	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+		
		Lac	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+		
		T ₁	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s		
<u>LYSOGENES</u>																		113	113
		B ₁ ⁻	21	46	1	23	3							1			95		
		B ₁ ⁺	2	9		7											18		
																		113	
<u>NON LYSOGENES</u>																		7	7
		B ₁ ⁻												4	1	5			
		B ₁ ⁺												1	1	2			
																		7	
sensibilité à λ														r	s				
Total			23	55	1	30	3							6	2			120	
		Nombre de recombinants ayant les caractères du parent :																	
		Lysogène				Non lysogène													
		Recombinants	Lys ⁺	Lys ⁻		Lys ⁺	Lys ⁻			Lys ⁺	Lys ⁻								
		Gal	112	0		1(?)	7			3	2								
		Mal	110	5		3	7			3	2								
		B ₁	95	5		18	2			7	7								
		Lac	81	0		32	7			7	7								
		T ₁	24	0		89	7			7	7								

Les recombinants prélevés au hasard sont classés suivant leur caractère lysogène ou non lysogène, B_1^+ ou B_1^- , et suivant les différentes combinaisons entre les caractères Gal, Mal, Lac et T_1 des deux parents. A droite, le phénotype du parent sensible, à gauche, le phénotype du parent lysogène.

Dans la partie inférieure du tableau est indiqué le nombre des recombinants lysogènes ou non lysogènes, ayant tel caractère du parent lysogène ou du parent sensible. Ce tableau est caractéristique des résultats obtenus dans un croisement entre une souche lysogène F^- et une souche sensible F^+ .

On peut conclure de ce croisement, d'une part, que la lysogénie ségrège dans les croisements entre bactéries lysogènes et sensibles, d'autre part, que la souche lysogène utilisée diffère de la souche sensible par deux caractères, dont l'un contrôle la lysogénie et l'autre la résistance à λ . E. Lederberg a pu montrer [3] que certaines souches lysogènes de *E. coli* K₁₂ sont sensibles à un mutant virulent, λ_2 , du bactériophage λ , alors que d'autres lui sont résistantes. Ces dernières — et c'est le cas de la souche W₁ — ségrègent à la fois le caractère lysogène et le caractère L₂r responsable de la résistance à λ_2 .

Le croisement entre bactéries lysogènes et bactéries sensibles a été répété à plusieurs reprises en faisant varier soit les moyens de sélection des recombinants (streptomycine), soit les souches lysogènes, soit les souches sensibles. Les résultats obtenus ont été essentiellement les mêmes.

La prédominance constante de bactéries lysogènes parmi les recombinants pouvait faire penser à une élimination des recombinants sensibles (par exemple, par induction spontanée du prophage dans l'hypothèse représentée par le schéma *d* de la fig. 1). Le fait que chez les recombinants lysogènes la majorité des caractères non sélectionnés demeureraient ceux du parent lysogène indiquait que ce ne pouvait être là la seule explication.

Il a été, en effet, découvert par Hayes [9] que la recombinaison chez *E. coli* K₁₂ comportait une *polarité*, certaines souches pouvant être considérées comme « donatrices », d'autres comme « réceptrices » de caractères. Puis simultanément Cavalli [10], Hayes [11] et Lederberg [12] montraient qu'il y avait *participation inégale* des deux parents à la constitution génétique des recombinants, ceux-ci conservant surtout les caractères de la souche réceptrice (F⁻). Fait essentiel, le caractère F⁺ ou F⁻ du parent porteur d'un certain marqueur affecte la proportion des recombinants qui posséderont ce marqueur. La polarité du phénomène de recombinaison, par contre, ne semble pas modifier la fréquence relative de remplacement de tel ou tel marqueur de la souche F⁻ par leurs allèles de la souche F⁺ [10]. Ceci revient à dire que la définition d'une mesure de linkage dans un tel système serait la probabilité pour que les recombinants ayant reçu un marqueur A du parent F⁺ présentent également un autre marqueur B, lui aussi issu du parent F⁺. Autrement dit, *le linkage ne peut être considéré qu'entre caractères venant du parent F⁺*.

Grâce à l'obligeance de W. Hayes qui a mis à notre disposition des souches de signe connu, il nous a été possible de déterminer la polarité des souches en notre possession. Comme il était prévisible, la souche 112-12 et les autres souches dérivées de K₁₂S sont F⁺, tandis que les souches B₁-T-L- (telles que W₁, W₃₃, W₆₇₇) sont F⁻. Il n'existe aucun moyen connu de

transformer une souche F^+ en F^- . Il est également impossible, à l'heure actuelle, de « guérir » à volonté une souche lysogène d'*E. coli*. Pour accroître la proportion de recombinants non lysogènes, force était donc d'avoir recours à des croisements $F^+ \times F^+$.

On sait, en effet [10, 11, 12], que les mélanges $F^- \times F^-$ ne donnent pas lieu à recombinaison. Les croisements $F^+ \times F^+$, par contre, sont fertiles, les deux souches parentes pouvant, dans certains cas, contribuer de façon sensiblement égale à la constitution génétique des recombinants. Le plus souvent cependant, la contribution de l'une des souches F^+ (relativement —) est plus importante que celle de l'autre (relativement +). C'est le cas du croisement entre les souches 58.161 (M^-) lysogène et 112-12 ($C - H - Gal - T_{1r}$) sensible, où la grande majorité des recombinants est non seulement lysogène et gal^+ , mais aussi sensible à T_1 . Si la polarité relative d'une souche F^+ dépend des marqueurs sélectionneurs, elle nous a semblé dépendre aussi des marqueurs non sélectionnés. Enfin, comme l'a montré Hayes [11], elle peut être modifiée par exposition au rayonnement U. V.

La souche 112-12 F^+ sensible a été croisée avec la souche W_{677} F^+ lysogène : un échantillon d'une même culture a été exposé à la lumière U.V. (croisement B), et l'autre non (croisement A). Les résultats de ce croisement sont rapportés dans le tableau II et peuvent être résumés de la manière suivante :

1° La proportion des recombinants non lysogènes, qui est de 23 p. 100 dans le croisement A, est portée à 52 p. 100 dans le croisement B.

2° La majorité des recombinants lysogènes présentent la plupart des caractères non sélectionnés du parent lysogène, la majorité des recombinants non lysogènes la plupart des marqueurs du parent sensible.

3° Tous les recombinants lysogènes sont galactose $_4^+$. Tous les recombinants non lysogènes sont galactose $_4^-$.

4° Parmi les recombinants non lysogènes, les uns sont sensibles au bactériophage λ , les autres lui sont résistants. Il existe une remarquable liaison entre la sensibilité à λ et le caractère maltose du parent sensible.

On peut conclure de cette expérience que le caractère lysogène ségrège dans les croisements entre souches lysogènes et sensibles, et qu'il existe un linkage entre ce caractère et un déterminant particulier qui commande l'utilisation du galactose. Un autre caractère, qui affecte la sensibilité à λ , ségrège également dans ces croisements, et accompagne un déterminant de l'utilisation du maltose.

TABLEAU II. — Croisement entre la souche W 677 F⁺ lysogène et la souche 112-12 F⁺ sensible à λ.

PARENTS	{W677 : B ₁ ⁻ Xyl ⁻ Man ⁻ Gal ₄ ⁺ Mal ₁ ⁻ (C ⁺ H ⁺)Lac ₁ ⁻ (T ⁻ L ⁻) (F ⁺)														
	{112-12 : B ₁ ⁺ Xyl ⁺ Man ⁺ Gal ₄ ⁻ Mal ₁ ⁺ (C ⁻ H ⁻)Lac ₁ ⁺ (T ⁺ L ⁺) (F ⁺)														
RECOMBINANTS	: (T ⁺ L ⁺ C ⁺ H ⁺)														
	Xyl	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Total
	Man	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
	Mal	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
	Lac	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	
CROISEMENT A :															
Lysogènes	{B ₁ ⁻	16	2								1				19
Gal ₄ ⁺	{B ₁ ⁺	7	6	3	1						1	2	2	3	25
															44
Non lysogènes	{B ₁ ⁻													1	1
Gal ₄ ⁻	{B ₁ ⁺				1				1		1	1	2	5	11
															12
Sensibilité à λ				s				s			r	r	s	s	
Total		23	8	4	1			1			1	4	1	4	9
															56
CROISEMENT B :															
Lysogènes	{B ₁ ⁻	27	9												36
Gal ₄ ⁺	{B ₁ ⁺	15	5								1				21
															57
Non lysogènes	{B ₁ ⁻	2													2
Gal ₄ ⁻	{B ₁ ⁺	4	2		1						2	28	23	60	
															62
Sensibilité à λ		r	r		r						r	s	s		
Total		48	16		1						3	28	23		119
Nombre de recombinants ayant les caractères du parent :															
Lysogène															
Croisement	Lys ⁺	A	Lys ⁻	Lys ⁺	B	Lys ⁻	Non lysogène								
Recombinants	Lys ⁺	A	Lys ⁻	Lys ⁺	B	Lys ⁻	Lys ⁺	A	Lys ⁻	Lys ⁺	B	Lys ⁻			
Gal	44	0	57	0			0	12	0	62					
B ₁	19	1	36	2			25	11	21	60					
Xyl	35	3	56	9			9	9	1	53					
Man	35	2	56	8			9	10	1	54					
Mal	35	2	57	11			9	10	0	51					
Lac	32	6	43	36			12	6	14	26					

Croisement B : la culture de W 677 a été soumise au rayonnement U. V. ; croisement A : témoin. La disposition est analogue à celle du tableau I. Le phénotype du parent sensible est à droite, celui du parent lysogène à gauche.

Le nombre de recombinants lysogènes ou non lysogènes ayant les caractères non sélectionnés soit du parent lysogène, soit du parent sensible, est indiqué au bas du tableau. (Tous les recombinants non lysogènes ont été testés après deux isollements. Les recombinants lysogènes ont été testés, soit directement, soit après un isolement seulement. Il est vraisemblable que les recombinants du croisement A figurant comme lysogènes à la droite du tableau n'ont pas le phénotype indiqué.)

Ce tableau est caractéristique des résultats obtenus dans un croisement entre une souche lysogène F⁺ et une souche sensible F⁺.

DISCUSSION.

Des résultats similaires à ceux qui viennent d'être décrits ont été obtenus par E. et J. Lederberg [6]. Ces auteurs ont pu

montrer aussi qu'il existe des souches non lysogènes de K_{12} résistantes à λ qui diffèrent quant à leur sensibilité au mutant virulent λ_2 : les unes, L_1r , sont sensibles à λ_2 , d'autres, L_2r , lui sont résistantes.

E. et J. Lederberg ont réalisé les croisements suivants avec les résultats indiqués :

Sensibles $\times L_1r$	Types parentaux.
Sensibles $\times L_2r$	Types parentaux.
$L_1r \times L_2r$	Types parentaux + sensibles.
$L_1r \times$ lysogènes L_2s	Types parentaux.
$L_2r \times$ lysogènes L_1s	Types parentaux + lysogènes L_2r + sensibles.

Ils en concluent que le caractère L_1r de résistance à λ est allélique de la sensibilité et de la lysogénie, la résistance à λ_2 , L_2r étant sous la dépendance d'un autre déterminant. C'est ce déterminant qui ségrège avec le caractère maltose.

HYPOTHÈSES CONCERNANT LE MÉCANISME DE LA RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE CHEZ *E. coli* K_{12} . — Toute analyse du déterminisme de la lysogénie dépend d'abord de l'interprétation qui aura été adoptée du phénomène de recombinaison génétique chez *E. coli* K_{12} .

L'hypothèse la plus simple et la plus plausible émise dès leur découverte, par Tatum et Lederberg [4], était celle d'une fusion bactérienne suivie de crossing-over et de ségrégation. L'existence de souches « diploïdes hétérozygotes » [13] qui ségrègent aussi bien les types parentaux que des recombinants, est venue renforcer cette interprétation.

Le phénomène de participation inégale des parents à la constitution génétique des recombinants faisant suite à l'observation d'anomalies dans la ségrégation des diploïdes hétérozygotes [5] remet en question la validité de cette interprétation, ou tout au moins oblige à la préciser davantage. Dans l'attente d'éléments nouveaux, on peut schématiser ainsi les hypothèses extrêmes :

Hypothèse de la fusion. — La recombinaison est la conséquence d'une fusion, aussi bien « cytoplasmique » que « nucléaire » des deux parents. Leur participation inégale à la constitution des recombinants n'est qu'un phénomène secondaire, pouvant être expliqué, soit par l'élimination ultérieure d'une partie du matériel génétique provenant du parent F^+ [12], soit par une contribution inégale des noyaux ou des « chromosomes » des deux souches parentes.

Hypothèse du transfert. — La participation inégale des deux parents est un phénomène primitif et non plus secondaire. Un recombinant est essentiellement constitué par le parent F^- , la contribution du parent F^+ étant limitée à une faible part de son

matériel génétique, dont le facteur F^+ pourrait être le vecteur [44].

Selon que l'une ou l'autre de ces hypothèses sera finalement vérifiée, le déterminisme génétique de la lysogénie devra être interprété de manière différente.

DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA LYSOGÉNIE. — *Dans l'hypothèse du transfert*, il n'est pas possible actuellement de faire un choix entre les représentations de la lysogénie illustrées par les schémas de la figure 1. La ségrégation de la lysogénie dans les croisements pourrait être due au fait que c'est tantôt l'un, tantôt l'autre parent qui joue le rôle de « donateur » ou de « récepteur », le recombinant étant essentiellement constitué par la bactérie « réceptrice ».

Le linkage observé entre la lysogénie et un déterminant qui gouverne l'utilisation du galactose ne serait qu'un pseudo-linkage, le locus galactose n'étant jamais, dans les croisements réalisés, inclus dans l'apport du parent F^+ .

Si, dans un croisement, il était possible de transférer à la fois les caractères lysogénie et galactose d'une souche F^+ à une souche F^- , le reste du phénotype des recombinants demeurant essentiellement celui du parent F^- , la liaison observée entre lysogénie et galactose prendrait toute sa signification et l'on pourrait conclure à la détermination de la lysogénie par le prophage lui-même, locus nucléaire. Des essais dans ce sens, où la souche F^+ lysogène et galactose⁺ était stérilisée par la streptomycine, n'ont jusqu'ici donné que des résultats négatifs.

Dans l'hypothèse de la fusion, il devient possible d'analyser les résultats des croisements selon les modèles illustrés par la figure 1.

La ségrégation du caractère lysogène élimine la représentation purement cytoplasmique de la lysogénie (fig. 1 a) et oriente vers une interprétation « nucléaire ».

Le linkage du caractère lysogène avec un déterminant particulier est incompatible avec la représentation faisant du prophage un élément nucléaire indépendant (fig. b) dont la présence suffit à l'expression de la lysogénie.

On est donc conduit à une interprétation proprement « génique » de la lysogénie, que ce soit le prophage lui-même qui se comporte comme un gène (fig. 1 c), ou que la lysogénie soit sous la dépendance d'un locus bactérien (fig. 1 d).

C'est la conclusion à laquelle aboutissent E. et J. Lederberg [6], à la suite, en particulier, d'expériences mettant en œuvre des diploïdes. En croisant un diploïde homozygote pour les caractères lysogénie et galactose₄⁺ avec un haploïde sensible et galactose₄⁻, ils obtiennent des recombinants diploïdes hétérozygotes pour la

lysogénie et le caractère galactose qui, pour ces deux caractères, ségrègent presque exclusivement les types parentaux.

Est-il possible de choisir entre les schémas *c* et *d* de la figure 1 ? La possibilité d'obtenir des clones lysogènes lorsqu'on met en contact une population de bactéries sensibles avec un bactériophage tempéré, suggère que la seule différence entre bactéries d'une souche sensible et bactéries lysogènes, est la présence du prophage (fig. 1 *c*). Une autre interprétation est que le bactériophage a sélectionné parmi les bactéries réceptives celles qui possédaient un facteur bactérien de compatibilité (fig. 1 *d*). Pour que cette interprétation soit valable, il faut que, dans une population donnée de bactéries sensibles, la fraction des bactéries susceptibles de devenir lysogènes, soit faible et indépendante des conditions extérieures. Il devrait également exister des souches possédant le déterminant de la lysogénie, dont l'infection par le bactériophage correspondant devrait être toujours réductive, et jamais productive [44].

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'éléments positifs permettant d'appuyer cette interprétation. Des souches entièrement lysogénisables n'ont jamais été observées. En revanche, il semble que l'indice d'infection [45], les variations de température [46], permettent dans certains cas d'accroître la proportion des bactéries lysogénisées.

En l'absence de preuves en faveur de la prédétermination d'une bactérie donnée à la lysogénisation, l'hypothèse la plus simple demeure donc celle qui fait du prophage lui-même le déterminant génétique de la lysogénie.

Cette conclusion ne laisse pas d'être surprenante, la lysogénie, transmission héréditaire d'un virus inapparent, semblant *a priori* devoir présenter les caractéristiques de l'hérédité cytoplasmique. Elle rejoint cependant une conception formulée ici même il y a de nombreuses années [47], et que des découvertes plus récentes paraissent devoir remettre en faveur.

Il m'est agréable de remercier particulièrement W. Hayes et J. J. Weigle pour les utiles discussions qui ont précédé la rédaction de cet exposé.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. WOLLMAN. *Bull. Inst. Pasteur*, 1928, **26**, 15.
- [2] A. LWOFF et A. GUTMANN. *Ces Annales*, 1950, **78**, 711.
- [3] E. M. LEDERBERG. *Genetics*, 1951, **36**, 560.
- [4] E. L. TATUM et J. LEDERBERG. *J. Bact.*, 1947, **53**, 673.
- [5] J. LEDERBERG, E. M. LEDERBERG, N. D. ZINDER et E. R. LIVELY. *Cold Spring Harbor Symp.*, 1951, **16**, 413.
- [6] E. M. LEDERBERG et J. LEDERBERG. *Genetics*, 1952 (sous presse).

- [7] T. M. SONNEBORN. *Heredity*, 1950, **4**, 11.
- [8] J. LEDERBERG. *Genetics*, 1947, **32**, 505.
- [9] W. HAYES. *Nature*, 1952, **169**, 118 et 1017.
- [10] L. L. CAVALLI, J. LEDERBERG et E. M. LEDERBERG. *J. Gen. Microbiol.*, 1953 (sous presse).
- [11] W. HAYES. *J. Gen. Microbiol.*, 1953 (sous presse).
- [12] J. LEDERBERG, L. L. CAVALLI et E. M. LEDERBERG. *Genetics*, 1952 **37**, 720.
- [13] J. LEDERBERG. *Proceed. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 1949, **35**, 178.
- [14] F. JACOB, A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 222.
- [15] J. S. K. BOYD. *J. Path. a. Bact.*, 1951, **63**, 445.
- [16] G. BERTANI, M. LIEB. Communications personnelles.
- [17] E. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1925, **39**, 789.

COLICINES ET BACTÉRIOPHAGES

par P. FREDERICQ (1).

(*Institut de Bactériologie de l'Université de Liège.*)

INTRODUCTION. — LES COLICINES.

L'origine des recherches sur les colicines est la démonstration par Gratia [21, 22] de la production d'une substance antibiotique diffusible par une souche d'*E. coli*. Cette souche, désignée coli V, produisait une substance antibiotique très active, supportant la dilution jusqu'à 10^{-3} , thermostable à 100° C., extrêmement diffusible, traversant la cellophane, précipitable par l'acétone, non antigénique et qu'il dénomma « principe V ». Elle exerçait son action sur une autre souche d'*E. coli*, dite coli ϕ , ainsi que sur une souche de *Sh. dysenteriae* mais n'entravait pas le développement d'autres souches d'*E. coli* testées.

Nous avons repris depuis 1945, seul ou en collaboration avec divers auteurs [14, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 24], des recherches sur les actions antibiotiques dans la famille des entérobactériacées. Nous en avons étudié un grand nombre de souches, principalement du groupe coli, et nous avons constaté que l'antagonisme type coli V-coli ϕ est beaucoup plus répandu et moins spécifique qu'on ne l'avait cru tout d'abord. En effet, 50 p. 100 environ des souches étudiées sont sensibles à l'action du coli V et 25 p. 100 environ inhibent le coli ϕ .

Les souches inhibant le coli ϕ n'agissent cependant pas toutes d'une manière identique à celle du coli V. Elles produisent, suivant la souche considérée, au moins 17 substances antibiotiques différentes qui se distinguent l'une de l'autre par leur spectre d'activité, la morphologie de la zone d'inhibition, la vitesse de diffusion dans la gélose, le passage à travers la cellophane, la thermorésistance, la sensibilité aux enzymes protéolytiques, la spécificité des mutants résistants, et pour lesquelles nous avons proposé le nom générique de *colicine*. Il y a les colicines A, B, C, etc., et le principe V de Gratia devient, tout naturellement suivant cette terminologie, la colicine V.

Le nom de *colicine* devait primitivement caractériser les

(1) Associé du Fonds National de la Recherche Scientifique

substances antibiotiques produites par des *E. coli*. Nous avons cependant constaté que de nombreuses souches de *Shigella*, certaines *E. freundii* et rarement des *Salmonella* produisent aussi des substances antibiotiques qui sont pour la plupart identiques ou apparentées à celles que produisent les *E. coli* et doivent donc rentrer dans le groupe des colicines.

Les colicines tuent les cellules sensibles sur lesquelles elles agissent, et, ce qui est remarquable, c'est leur étroite spécificité. Leur action se limite en effet à la famille des entérobactériacées et chaque colicine n'attaque jamais qu'un certain nombre de souches des différents genres de cette famille. Les *Escherichia* et les *Shigella* sont souvent sensibles à une ou plusieurs colicines, parfois à toutes, tandis que les *Salmonella*, *Aerobacter*, et surtout *Proteus* le sont beaucoup plus rarement et seulement à certaines d'entre elles.

La distinction de 17 colicines différentes suivant les souches antibiotiques considérées a été basée en ordre principal sur la spécificité des mutants résistants qu'elles sélectionnent, mais si l'on considère également d'autres caractères distinctifs, leur nombre augmente encore. Certaines colicines semblent bien être un complexe de plusieurs substances, en proportions variables suivant les souches qui les produisent, ayant des propriétés distinctes mais une spécificité d'action à peu près identique. La distinction en colicines E, F, J, S2, S3 et S5 résultait vraisemblablement de l'intervention de tels complexes et nous les réunissons actuellement sous le nom de colicine E, ce qui ramène à 12 le nombre de colicines produites par différentes souches. C'est probablement aussi des complexes de cette nature qui ont été étudiés par Chabbert [7].

On peut donc définir les colicines comme étant des substances, ou des complexes de substances antibiotiques diffusibles, spécifiques, produites par certaines souches d'entérobactériacées, et dont l'action bactéricide ne s'exerce que sur d'autres souches de la même famille.

La production de substances antibiotiques diffusibles par certaines souches d'*E. coli* et de *Shigella*, et la spécificité de leur action, ont été confirmées par divers auteurs [7, 12, 25, 26, 28, 29, 30, 37, 38, 43]. D'après les travaux de Heatley et Florey [31] et de Gardner [20], les colicines seraient de nature protéique ou polypeptidique.

Gratia déjà avait été frappé de la ressemblance que présente l'antagonisme coli V-coli ϕ avec le phénomène de bactériophagie, et il est significatif que plusieurs auteurs ayant étudié des souches productrices de colicine ont d'abord pensé à des souches lyso-gènes. Nous allons voir que cette ressemblance ne se limite pas

à de simples analogies, mais traduit des relations beaucoup plus étroites entre les deux agents que sont, d'une part, les colicines, sécrétions microbiennes, et, d'autre part, les bactériophages, unités biologiques transmissibles, douées de continuité génétique.

I. — ANALOGIES ENTRE COLICINES ET BACTÉRIOPHAGES.

a) SIMILITUDE DE DISTRIBUTION DES SOUCHES COLICINOGENES, DES SOUCHES LYSOGENES ET DES BACTÉRIOPHAGES. — Des souches colicinogènes, comme des souches lysogènes, se rencontrent fréquemment dans la famille des entérobactériacées. Nous en avons trouvé parmi des souches isolées en Belgique, en France, en Grande-Bretagne, en Suède et aux Etats-Unis, de matières fécales d'espèces animales les plus diverses. L'emploi de techniques sélectives a d'ailleurs permis de démontrer leur présence dans la presque totalité des selles humaines ou animales étudiées. Elles apparaissent dès les premiers jours de la vie et se rencontrent chez des individus de tout âge.

L'étude qualitative de la flore antibiotique au cours de diverses maladies intestinales a montré que chez les malades atteints de fièvre paratyphoïde B on isole, beaucoup plus souvent que chez les individus normaux, des souches productrices de colicine B, c'est-à-dire d'une colicine précisément active contre *S. schottmuelleri*, l'agent causal de cette affection. Les selles prélevées moins de quinze jours après le début de la maladie se comportent comme les selles d'individus normaux, tandis que le pourcentage de selles renfermant des souches productrices de colicine B augmente de quinze à trente jours après le début de l'affection pour revenir à la normale au delà de trente et un jours, à l'exception des selles qui proviennent de malades restant porteurs de germes et qui montrent corrélativement un pourcentage particulièrement élevé de souches B. Or, on sait, et nous l'avons récemment confirmé, que des bactériophages actifs contre *S. schottmuelleri* se rencontrent aussi le plus souvent dans les selles d'individus atteints de fièvre paratyphoïde B. Une corrélation entre affection dysentérique et présence dans les selles de germes inhibant les bacilles dysentériques a été également signalée par Halbert [28].

b) SIMILITUDE D'ACTIVITÉ DES SOUCHES COLICINOGENES, DES SOUCHES LYSOGENES ET DES BACTÉRIOPHAGES. — Nous avons étudié ailleurs, en détail, et nous n'y reviendrons pas ici, le spectre d'activité de nombreuses souches colicinogènes. Rappelons qu'il s'agit d'actions antibiotiques très spécifiques qui ne s'exercent que dans le cadre de la famille des entérobactériacées et qui dépendent de la nature

des colicines produites par chaque souche antibiotique considérée. Les diverses colicines identifiées ont un champ d'action très différent. Certaines n'attaquent que très peu de souches, d'autres ont un spectre d'activité beaucoup plus étendu. Certaines inhibent le plus souvent des germes du genre *Escherichia* ; d'autres sont surtout spécialisées dans l'attaque des *Shigella* ; peu d'entre elles agissent sur les *Aerobacter* et les *Salmonella*.

Une telle spécificité, variable d'ailleurs suivant la colicine considérée, s'observe aussi chez les bactériophages. Il existe, en effet, des bactériophages lysant très peu de souches et d'autres ayant un spectre d'activité beaucoup plus étendu. Comme dans le cas des colicines, la sensibilité à divers bactériophages permet de séparer les différents membres du groupe coli, et, chez les *Salmonella* et les *Shigella*, elle est également en corrélation avec la constitution antigénique de ces germes. Comme les colicines, enfin, les bactériophages de *Shigella* sont très fréquents et attaquent souvent aussi les *E. coli* tandis que les bactériophages actifs contre les *Salmonella* sont plus rares.

Déjà en 1932, Gratia [22] avait noté un parallélisme étroit entre la façon dont une souche lysogène, le coli Lisbonne, engendre du bactériophage et la façon dont le coli V produit son principe actif. Nos recherches actuelles confirment sur une vaste échelle la ressemblance des deux phénomènes :

Comme la propriété lysogène, la propriété de produire une colicine déterminée est un caractère héréditaire extrêmement stable ; le coli V isolé par Gratia en 1925 produit toujours, vingt-cinq ans plus tard, la même colicine, et de nombreuses autres souches étudiées pendant six à sept ans n'ont pas varié.

De même que les souches lysogènes ne sont pas sensibles au bactériophage qu'elles portent, mais sont éventuellement sensibles, au même titre que les souches non lysogènes, à d'autres bactériophages, ainsi les souches colicinogènes ne sont jamais sensibles à la colicine qu'elles produisent, mais peuvent être inhibées par d'autres colicines.

De même que certaines souches lysogènes peuvent libérer plusieurs bactériophages différents, certaines souches antibiotiques produisent 2 et parfois 3 colicines distinctes.

Toujours comme les bactériophages des souches lysogènes, enfin, les colicines produites par des *E. coli* attaquent le plus souvent d'autres *E. coli*, et les colicines produites par des *Shigella* attaquent le plus souvent d'autres *Shigella*.

c) SIMILITUDE D'ASPECT DES ZONES D'INHIBITION ET DES TACHES DE BACTÉRIOPHAGIE. — La morphologie des zones d'inhibition produites sur gélose est très variable suivant les souches antibiotiques

considérées et dépend de la nature de la ou des colicines qu'elles produisent. Des différences intéressent notamment l'étendue de la zone d'inhibition ; certains germes actifs s'entourent d'une zone d'inhibition très étroite, pour d'autres, au contraire, le diamètre peut dépasser 50 mm. Des différences apparaissent aussi dans l'aspect de la culture sensible à la limite de la zone d'inhibition. Dans certains cas, cette limite est très nette, comme tranchée au couteau ; dans d'autres cas, la zone de croissance normale se fond progressivement dans une zone d'inhibition totale par l'intermédiaire d'une zone de transition plus ou moins étendue montrant une croissance partielle de la souche sensible ; il peut y avoir plusieurs zones de croissance partielle donnant alors l'aspect en cocarde, ou une croissance partielle peut recouvrir toute la zone d'inhibition ; dans la zone de croissance normale peut apparaître dans la suite une lyse secondaire plus ou moins accentuée, la zone d'inhibition s'entourant alors d'un anneau de lyse périphérique. Enfin, il y a aussi de grandes différences dans le nombre et l'aspect des colonies résistantes apparaissant dans la zone d'inhibition. Elles peuvent faire défaut, ou se montrer en nombre plus ou moins élevé et de taille variable suivant les cas. Ces différences sont très spécifiques et se manifestent non seulement lorsque l'on fait agir différentes souches actives sur la même souche sensible, mais aussi lorsqu'on fait agir une même souche active sur différentes souches sensibles.

Les différences dans la morphologie des zones d'inhibition déterminées par diverses souches productrices de colicine sont comparables aux différences observées dans les taches de lyse produites par différents bactériophages. De même qu'il y a des bactériophages à grandes ou à petites taches, il y a des souches produisant de grandes ou de petites zones d'inhibition. Les taches où les zones d'inhibition peuvent être vierges de toute croissance, montrer une croissance partielle continue ou un nombre variable de colonies résistantes. Le bord des taches, comme celui des zones d'inhibition, peut être net ou progressif, parfois en cocarde, et s'entourer, dans la suite, d'une zone de lyse secondaire.

Les zones d'inhibition provoquées par les souches productrices de colicine reproduisent, en fait, à une échelle beaucoup plus grande, toutes les modalités morphologiques des taches produites par les bactériophages. Dans les deux cas interviennent la spécificité de l'agent inhibiteur et la nature de la souche inhibée.

d) SIMILITUDE DES RÉCEPTEURS DE LA SOUCHE SENSIBLE. — Comme la sensibilité aux différentes colicines est très variable d'une souche à l'autre, il importait de savoir si un germe sensible présente un seul point d'attaque caractéristique du type de sensibilité de ce germe et identique pour toutes les colicines auxquelles il

est sensible, ou si, au contraire, il présente différents points d'attaque, spécifiques de chacune de ces colicines. En d'autres termes, une souche sensible possède-t-elle un seul récepteur d'antibiose, dont la nature détermine la sensibilité particulière de cette souche, ou bien présente-t-elle plusieurs récepteurs d'antibiose, dont le nombre détermine l'étendue de sa sensibilité ? L'étude des mutants résistants montre qu'un germe sensible présente plusieurs récepteurs d'antibiose, spécifiques de chacune des colicines auxquelles il est sensible. En effet, le mutant résistant d'une souche sensible à plusieurs colicines ne perd pas en bloc la sensibilité générale de cette souche, mais uniquement la sensibilité à la colicine qui l'a sélectionné, tout en conservant vis-à-vis des autres colicines une sensibilité identique à celle de la souche dont il dérive. Il n'a pas acquis une sensibilité différente de celle de la souche-mère, il a uniquement perdu le récepteur correspondant à la colicine pour laquelle il est devenu résistant mais conserve intacts ses autres récepteurs.

La présence de ces récepteurs de colicines est une propriété héréditaire stable, caractéristique de chaque souche considérée, mais susceptible de disparaître par mutation. Par la technique de Luria et Delbruck [35], on démontre aisément que ces mutations se produisent spontanément et que les mutants résistants sont simplement sélectionnés par les colicines. Les mutations intéressant ces récepteurs sont spécifiques et indépendantes l'une de l'autre. Par une série de mutations successives, on peut transformer une souche primitivement sensible à de nombreuses colicines en une souche totalement résistante, en lui faisant perdre successivement tous les récepteurs qui la caractérisent. Les mutations intéressant les récepteurs de colicine se produisent, en règle générale, indépendamment des autres caractères de la souche-mère, et, inversement, les mutations intéressant d'autres caractères n'affectent pas ces récepteurs. Les mutations intéressant les récepteurs de colicine sont donc absolument comparables aux mutations intéressant les récepteurs de bactériophages.

La présence des récepteurs de colicines, comme celle des récepteurs de bactériophages, est déterminée par des facteurs héréditaires susceptibles de disparaître par mutation, mais aussi de se recombinaison par croisement génétique, indépendamment les uns des autres. En effet, le croisement génétique suivant la technique de Lederberg [33] de deux souches parentes marquées par la résistance ou la sensibilité à diverses colicines fait apparaître de nombreux types de recombinaison de ces caractères. Comme dans le cas de la sensibilité aux bactériophages, la fréquence anormale de certains types de recombinants semble indiquer l'enchaînement linéaire de différents allèles.

Comme les récepteurs de bactériophages, enfin, les récepteurs

de colicines fixent, en la neutralisant, la colicine correspondante, ainsi que nous l'avons montré pour la colicine K, et Bordet et Beumer [6] pour la colicine V. Ces auteurs ont, de plus, constaté qu'un sérum anti-bactérien protège la souche sensible contre les colicines, comme il la protège contre les bactériophages.

II. — RÉCEPTEURS COMMUNS A CERTAINES COLICINES ET A DES BACTÉRIOPHAGES DÉTERMINÉS.

Nous venons de voir que les récepteurs de colicines se comportent exactement comme les récepteurs de bactériophages. Ils en sont cependant indépendants et distincts. En effet, l'étude des mutants dérivés d'une souche sensible à la fois à de nombreuses colicines et bactériophages différents montre que le mutant résistant à une colicine déterminée conserve, vis-à-vis des autres colicines et bactériophages, une sensibilité identique à celle de la souche-mère dont il dérive, et que le mutant résistant à un bactériophage déterminé reste sensible aux autres bactériophages et colicines actives sur la souche-mère. Dès 1946, cependant, nous avions observé qu'un mutant de coli φ , obtenu par résistance successive à diverses colicines, était devenu résistant à certains bactériophages, et, l'année suivante, Bordet [5] constatait qu'un mutant, obtenu par résistance à un bactériophage, avait perdu la sensibilité à la colicine V.

Nous allons voir qu'une résistance croisée spécifique et réciproque entre colicines et bactériophages se retrouve de façon constante dans le cas de certaines colicines et certains bactériophages déterminés et traduit donc l'identité de leurs récepteurs.

a) RÉSISTANCE CROISÉE AUX COLICINES E ET K ET AUX BACTÉRIOPHAGES II ET III. — En étudiant l'action de 65 bactériophages différents, sur une souche-mère de *Sh. sonnei* désignée E. 90 et sur 8 mutants successifs qui en dérivent par résistance en cascade aux colicines, nous avons constaté que deux groupes de phages perdent leur activité sur certains de ces mutants, comme le montre le tableau I. Les mutants successifs sont désignés par le symbole E. 90/V pour le premier mutant issu de E. 90 et résistant à la colicine V, par le symbole E. 90/VE pour le deuxième mutant issu du premier mutant E. 90/V et résistant à la colicine E, par le symbole E. 90/VEJ pour le troisième mutant issu du deuxième mutant E. 90/VE et résistant à la colicine J, et ainsi de suite.

Ce tableau I montre, en effet, que les phages du groupe II inhibent la souche-mère et le premier mutant mais perdent toute action sur les mutants ayant acquis la résistance à la colicine E, et que les phages du groupe III, parmi lesquels figure le bacté-

TABLEAU I.

	<u>Phages</u>				<u>Colicines</u>								
	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>J</u>	<u>K</u>	<u>B</u>	<u>D</u>	<u>S₂</u>	<u>S₄</u>	
E. 90	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
E. 90/V	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
E. 90/VE	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
E. 90/VEJ	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
E. 90/VEJK	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
E. 90/VEJKB	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
E. 90/VEJKBD	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
E. 90/VEJKBDS ₂	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
E. 90/VEJKBDS ₂ S ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

riophage T. 6 de Demerec et Fano [10], perdent de même toute action sur les mutants ayant acquis la résistance à la colicine K. Les phages des groupes I et IV, enfin, sont très disparates et groupent manifestement tous ceux qui ne rentrent pas dans les deux autres groupes. Ils exercent une action identique sur la souche-mère et les mutants qui en dérivent (sauf que ceux du groupe IV sont sans action sur le dernier mutant car celui-ci a acquis une résistance non spécifique, vraisemblablement due à son caractère extrêmement muqueux).

La résistance aux phages II et III, qui apparaît après résistance respectivement aux colicines E et K, est conditionnée uniquement par la résistance à ces colicines, indépendamment des autres résistances. En effet, cette résistance croisée spécifique apparaît chez les mutants dérivés directement de la souche-mère par résistance aux seules colicines E ou K, et, réciproquement, chez les mutants sélectionnés par résistance aux phages II ou III, comme le montre le tableau II.

Nous avons confirmé l'existence de cette résistance croisée

TABLEAU II.

	Phages			Colicines		
	II	III	autres	E	K	autres
E. 90	+	+	+	+	+	+
E. 90/II	-	+	+	-	+	+
E. 90/E	-	+	+	-	+	+
E. 90/III	+	-	+	+	-	+
E. 90/K	+	-	+	+	-	+
E. 90/autres phages	+	+	+	+	+	+
E. 90/autres colicines	+	+	+	+	+	+

spécifique entre colicine E et bactériophage II d'une part, entre colicine K et bactériophage III d'autre part, sur des centaines de mutants dérivés de diverses souches sensibles. Elle se vérifie aussi par l'étude de recombinants génétiques. En effet, si dans des expériences de croisement génétique suivant la technique de Lederberg [33], on marque un des parents par résistance aux colicines E et K, on constate que, sans aucune exception, tous les recombinants ayant hérité de la résistance à la colicine E, et ceux-là seuls, sont résistants aux bactériophages II, tous les recombinants ayant hérité de la résistance à la colicine K, et ceux-là seuls, sont résistants aux bactériophages III. Les souches sensibles à la fois aux colicines E ou K et aux bactériophages II ou III possèdent donc un récepteur commun à la colicine et au bactériophage correspondant.

Les bactériophages II, d'une part, et les bactériophages III, d'autre part, appartiennent évidemment aux mêmes groupes de résistance. Les phages II ont un spectre d'activité beaucoup plus étendu que celui des phages III et attaquent notamment *S. schottmuelleri*. Comme ces phages II sont actifs sur *S. schottmuelleri*, il n'est peut-être pas étonnant qu'on les rencontre le plus souvent dans les selles d'individus atteints de fièvre paratyphoïde B. Mais ce qui est plus curieux, c'est que presque tous les bactériophages isolés de telles selles appartiennent au type II. Il n'y a pas de relation entre la présence dans les selles de souches productrices de colicine E et de bactériophages II d'une part, de souches productrices de colicine K et de bactériophages III d'autre part. Mais la présence de bactériophages du type II paraît liée à la présence concomitante de souches productrices de colicine B, deux agents ayant comme caractère commun d'attaquer *S. schottmuelleri*.

b) RÉSISTANCE CROISÉE A LA COLICINE C ET AUX BACTÉRIOPHAGES T.1 ET T.5. — Un troisième type de résistance croisée entre colicines et bactériophages avait échappé à nos observations précédentes du fait que les bactériophages T. 1 et T. 5 (de Demerec et Fano [40]) qui la déterminent ne sont pas actifs sur *Sh. sonnei*, notamment sur la souche E.90 précédemment utilisée. Cette résistance croisée a été observée dans des conditions assez particulières qui nous ont conduit temporairement à une interprétation erronée du phénomène.

Les souches colicinogènes sont, au même titre que les souches non antibiotiques, éventuellement sensibles à l'action de divers bactériophages. Les mutants résistants qui en dérivent conservent toujours une action antibiotique absolument identique à celle de la souche-mère. Nous avons cependant observé une exception à

cette règle générale. Tous les mutants résistants de la souche *E. coli* V de Gratia, sélectionnés par les phages T. 1 ou T. 5, mais pas par d'autres (2), ont acquis la propriété nouvelle de produire, outre la colicine V caractéristique de la souche-mère dont ils dérivent, une seconde colicine, désignée colicine M, totalement distincte. Il s'agit d'une mutation spécifique, prévisible et pouvant être reproduite à volonté.

Cette colicine M est non seulement distincte de la colicine V, mais aussi des autres colicines connues, et, chose curieuse, elle détermine une résistance croisée avec les phages T. 1 ou T. 5 qui ont provoqué son apparition. Devant la parenté existant entre la colicine M et les phages T. 1-T. 5, il était tentant de conclure à une mutation induite par les phages. Par la technique de Luria et Delbrück [35], on démontre bien que les mutants de coli V résistant aux phages T. 1 ou T. 5 préexistent dans la culture initiale, mais rien ne permet d'affirmer qu'ils possèdent déjà la propriété antibiotique nouvelle. Si l'apparition de cette propriété est consécutive à une action directe des phages, elle ne se manifesterait évidemment que chez les cellules ayant échappé à la lyse, c'est-à-dire les mutants résistants.

Le fait que les phages T. 1 et T. 5 n'exercent cet effet que sur la souche coli V, à l'exclusion de toute autre, allait cependant à l'encontre de la théorie de l'induction et nous l'avons définitivement abandonnée quand nous avons obtenu des mutants produisant la colicine M sous l'effet d'un agent tout différent, la colicine C à laquelle le coli V est sensible. Parmi les mutants de coli V que sélectionne la colicine C, certains, en effet, ont acquis également la résistance aux phages T. 1 et T. 5 et produisent alors la colicine M. De plus, en faisant agir une même dose de colicine C sur différentes subcultures du coli V, on constate que non seulement le nombre de mutants résistant à la colicine C peut être très différent d'une subculture à l'autre, mais parmi eux la proportion de mutants résistant aussi à T. 1 et T. 5 et produisant la colicine M est également très variable. Ceci prouve donc que la mutation déterminant la production de colicine M, comme celle amenant la résistance à la colicine C, survient spontanément. Les mutants produisant la colicine M sont sélectionnés par la colicine C au même titre que par les phages T. 1-T. 5, tout simplement du fait que la colicine C, comme la colicine M, détermine une résistance croisée avec ces deux phages. Les colicines C et M et les bactériophages T. 1 et T. 5 agissent donc sur un même récepteur bactérien.

(2) Le phage T. 7, antérieurement signalé comme produisant le même effet, était contaminé de T. 5.

III. — INTERVENTION DE COLICINE K OU D'UNE SUBSTANCE APPARENTÉE DANS LA CONSTITUTION DES PARTICULES DE CERTAINS BACTÉRIOPHAGES.

Comme la colicine E et les phages II ou la colicine K et les phages III agissent sur le même récepteur, on devait s'attendre à ce que ces colicines et ces phages aient le même spectre d'activité. Or, en étudiant leur action sur de nombreuses souches sensibles, nous avons constaté que certaines souches sont inhibées par les colicines sans être apparemment sensibles aux phages correspondants. Les phages II ou III exercent cependant sur ces souches une action inhibitrice nette à condition de les employer à forte concentration (10^9 à 10^{10} particules par millilitre). Cette action inhibitrice ne s'accompagne pas de multiplication des particules de phage mais, comme dans le cas des souches qui en permettent la multiplication, elle ne s'exerce que sur des souches sensibles aux colicines E ou K respectivement et disparaît spécifiquement chez les mutants résistant à ces colicines. Une telle action bactéricide, sans multiplication des particules, a déjà été observée par Sertic et Boulgakov [41] dans le cas d'un phage anti-*Salmonella* agissant sur *S. typhi*, et par Guelin [27] dans le cas du phage C. 16 de Burnet agissant sur la souche *E. coli* C. 36 (3).

Cette action bactéricide des phages II ou III sur des souches qui ne permettent pas leur multiplication diffère des actions bactériophagiques typiques du fait qu'elle ne s'accompagne pas de multiplication des particules. Il en résulte qu'elle s'épuise rapidement par dilution et ne se manifeste jamais sous forme de taches isolées. Par exemple, si on dépose une goutte d'une série de dilutions de 1/10 en 1/10 des phages II ou III, d'une part, sur une boîte d'eau peptone géloséeensemencée uniformément de la souche *E. coli* B qui assure leur multiplication, et, d'autre part, sur une boîteensemencée de la souche Co. 270 qui ne permet pas leur multiplication, on obtient les résultats consignés dans le tableau III.

Les phages II et III agissent donc comme des bactériophages typiques sur la souche B tandis qu'ils se comportent de façon très différente vis-à-vis de la souche Co. 270. Ils agissent alors à la manière d'un antibiotique, et plus particulièrement comme les colicines E et K, puisque les phages II n'ont plus d'action

(3) Nous avons étudié le phage C. 16 et la souche C. 36 et nous avons constaté que le phage C. 16 est du type III et perd son action bactéricide sur le mutant de C. 36 résistant à la colicine K. Le phénomène décrit par Guelin est donc un cas particulier de l'action bactéricide des bactériophages du type III sur des souches qui ne permettent pas leur multiplication, mais sont sensibles à la colicine K.

TABLEAU III.

Dilution	Phage II		Phage III	
	Sur B	Sur CO.270	Sur B	Sur CO.270
10^0	++	++	++	++
10^{-1}	++	+	++	P
10^{-2}	++	P	++	-
10^{-3}	++	-	++	-
10^{-4}	++	-	+	-
10^{-5}	++	-	tnT	-
10^{-6}	tnT	-	nT	-
10^{-7}	nT	-	T	-
10^{-8}	T	-	-	-

(++ = lyse confluyente totale; + = lyse confluyente presque totale; P = lyse confluyente mais partielle; tnT, nT et T = très nombreuses, nombreuses ou quelques taches isolées).

sur le mutant de Co. 270 résistant à la colicine E et les phages III sur le mutant résistant à la colicine K (tableau IV).

TABLEAU IV.

Dilution	Action sur CO.270				Action sur CO.270/E				Action sur CO.270/K			
	II	III	E	K	II	III	E	K	II	III	E	K
10^0	++	++	++	++	-	++	-	++	++	-	++	-
10^{-1}	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
10^{-2}	P	P	P	P	-	P	-	P	P	-	P	-
10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

On peut cependant se demander si l'action inhibitrice des phages II et III résulte bien d'une action directe des phages eux-mêmes ou si elle ne traduit pas plutôt la présence dans les lysats, à côté des particules de phage, d'une substance antibiotique du type colicine E ou K.

D'après Guelin [27], l'action bactéricide du phage C. 16 (qui appartient au groupe III, comme nous l'avons montré) sur la souche C. 36 résulte d'une action directe des particules de phage, car elle disparaît si on neutralise ces particules par un sérum antiphage ou si on les élimine par saturation avec des bactéries sensibles. Nous avons confirmé les expériences de Guelin, en employant le phage T. 6 de Demerec et Fano [10] comme phage

du type III et la souche Co. 270 qui n'en permet pas la multiplication; dans ce cas également l'action bactéricide disparaît après neutralisation par un sérum antiphage ou par saturation avec des bactéries sensibles. Il est cependant possible que la neutralisation par un sérum antiphage ou la saturation avec des bactéries sensibles éliminent non seulement les particules de phage, mais aussi une substance antibiotique éventuelle du type de la colicine K puisque cette colicine a la même spécificité d'action que le phage et se fixe sur le même récepteur bactérien.

L'étude de la cinétique de l'action bactéricide du phage T. 6 sur la souche Co. 270 montre de façon formelle l'intervention directe des particules de phage. En effet, dans des mélanges en proportion variable de cellules bactériennes et de particules de phage, le nombre de germes survivants après un temps donné est toujours égal au nombre de germes qui n'ont pas fixé de particules. L'expérience est réalisée de la manière suivante : on titre le nombre de cellules bactériennes et de particules de phage avant (N_0 et p_0) et dix minutes après le mélange (N et p). On calcule alors directement la proportion des germes survivants N/N_0 et indirectement la proportion des germes qui n'ont pas fixé de particules d'après la formule $P(o) = e^{-n}$ ou $n = \frac{p^{(1)} - p}{N_0}$ [2].

Le tableau V montre l'identité des valeurs de N/N_0 et de $P(o)$, tout au moins dans les limites d'erreur inhérentes aux techniques de titrage.

TABLEAU V.

$\frac{N_0}{(x 10^6)}$	$\frac{p_0}{(x 10^6)}$	$\frac{N}{(x 10^6)}$	$\frac{p}{(x 10^6)}$	$\frac{N}{N_0}$	$P(o)$
230	600	16	10	0,07	0,08
380	70	300	3	0,8	0,8
38	70	6,2	30	0,2	0,3
3,8	70	0,1	40	0,03	(-)
300	800	40	10	0,13	0,07
300	80	250	0,6	0,83	0,77
300	8	290	0,1	0,99	0,98

Puisque les germes survivants sont ceux qui n'ont pas fixé de particules de phage, il est non seulement évident que l'action bactéricide résulte de l'intervention directe de ces particules, mais encore qu'une seule particule suffit à tuer la cellule qui la fixe.

Réciproquement, on pouvait se demander si ce que nous appe-

lons colicine K n'est pas en réalité un bactériophage constitué de particules comparables à celles de T. 6 mais qui, contrairement à T. 6, ne se multiplieraient sur aucune souche sensible et dont la nature bactériophagique nous échapperait par conséquent. S'il en était ainsi, la proportion des germes survivant à la colicine K devrait, comme celle des germes survivant au bactériophage T. 6, être une fonction exponentielle traduisant une distribution en série de Poisson. Or, il n'en est rien et elle est au contraire en relation directe avec la concentration de colicine K et le nombre de cellules sur lequel elle agit (tableau VI).

TABLEAU VI.

No (cellules CO.270)	Concentration colicine K	N (germes survivants)	N/No (proportion survivants)
200.10 ⁶	1/10	100.10 ⁶	0,5
20.10 ⁶	1/10	98.10 ⁴	0,05
2.10 ⁶	1/10	113.10 ²	0,005
20.10 ⁶	1/1	12.10 ⁴	0,0032
20.10 ⁶	1/2	24.10 ⁴	0,0063
20.10 ⁶	1/4	5.10 ⁵	0,013
20.10 ⁶	1/8	14.10 ⁵	0,037

Le bactériophage T. 6 exerce donc sur certaines souches qui ne permettent pas sa multiplication une action bactéricide comparable à celle de la colicine K. Elle en diffère cependant du fait que chez T. 6 cette action est liée à des particules qui se distribuent suivant la formule de Poisson.

La dissociation d'une action bactéricide et de la faculté de se multiplier a été observée par d'autres auteurs en faisant agir certains phages en absence de facteurs de croissance [39], en absence de calcium [1, 3], en présence de proflavine [13] ou à température élevée [4]; elle a été aussi provoquée artificiellement en faisant agir sur des souches microbiennes qui en assurent normalement la multiplication des phages « inactivés » par les rayons U.V. [8, 11, 36, 40], par les rayons X [42] ou par chocs osmotiques [32].

En accord avec Luria [34] nous avons constaté que le bactériophage T. 6 inactivé par irradiation ultra-violette conserve une action bactéricide sans multiplication des particules sur la souche *E. coli* B, qui assurait sa multiplication avant inactivation. Cette action bactéricide du phage inactivé sur la souche *E. coli* B est absolument comparable à celle que le phage normal exerce

d'emblée sur la souche Co. 270. Elle se manifeste, en effet, suivant une courbe d'allure exponentielle montrant qu'elle est liée à la présence des particules, et disparaît sur les mutants de *E. coli* B résistant à la colicine K.

Il importait de savoir si cette action bactéricide sans multiplication des particules résulte d'un affaiblissement de l'action du phage, affaiblissement relatif lorsqu'elle ne s'observe que sur certaines souches peut-être moins sensibles, ou absolu lorsqu'elle apparaît après inactivation par les rayons ultra-violets, ou bien si l'action bactéricide et la faculté de se multiplier sont deux propriétés distinctes. Si l'on compare l'action sur les souches *E. coli* B et Co. 270 du phage T. 6 avant et après irradiation par des doses croissantes de rayons U.V. (tableau VII), on constate que des doses relativement faibles d'U.V. suppriment la multiplication de T. 6 sur *E. coli* B, ne laissant subsister qu'une action bactéricide, alors qu'elles sont pratiquement sans effet sur l'action bactéricide que T. 6 exerce d'emblée sur l'autre souche. Puisque l'irradiation supprime la propriété de se multiplier sans modifier l'action bactéricide, la faculté de se multiplier et l'action bactéricide sont deux propriétés distinctes et indépendantes de la particule du phage T. 6.

TABLEAU VII.

	Dilution du phage	Après irradiation pendant					
		0	30"	1'	2'	4'	8'
Sur <i>E. coli</i> B	10 ⁻⁰	++	++	++	++	++	++
	10 ⁻¹	++	++	+	+	+	P
	10 ⁻²	++	++	T _{sv} P	P	P	(P)
	10 ⁻³	++	++	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	++	tnT	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	+	T	-	-	-	-
	10 ⁻⁶	tnT	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁷	nT	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁸	T	-	-	-	-	-
Sur Co. 270	10 ⁻⁰	++	++	++	++	+	+
	10 ⁻¹	P	P	P	P	P	P
	10 ⁻²	(P)	(P)	(P)	(P)	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-

Le constituant de la particule de phage responsable de l'effet bactéricide détermine aussi sa spécificité d'action, qui est celle de la colicine K. En effet, toutes les souches sensibles à la colicine K, et celles-là seules, sont sensibles à l'action bactéricide

du bactériophage T. 6 irradié ou non, bien qu'elles n'en permettent pas toutes la multiplication. De plus, le bactériophage T. 6, irradié ou non, perd toute action tant sur le mutant de B résistant à la colicine K que sur le mutant de Co. 270 résistant à cette même colicine. Le constituant de la particule responsable de l'action bactéricide est donc une substance apparentée, sinon identique à la colicine K.

Si le constituant qui détermine la spécificité d'action du bactériophage T. 6 est identique ou apparenté à la colicine K, il n'intervient cependant pas pour déterminer sa spécificité sérologique. En effet, un sérum anti-phage T. 6 n'a pas d'action sur la colicine K, et des essais de préparation d'un sérum anti-colicine K sont restés infructueux. Cette absence de relation antigénique entre le phage T. 6 et la colicine K ne doit d'ailleurs pas nous surprendre car si on recherche l'action de ce sérum anti-phage T. 6, d'une part sur les bactériophages C. 16 (de Burnet) et BF. 29 (récemment isolé), qui appartiennent comme T. 6 au groupe III et ont une spécificité d'action identique à celle de la colicine K, et, d'autre part, sur les bactériophages T. 2 et T. 4, qui n'appartiennent pas au groupe III mais sont connus comme étant sérologiquement apparentés à T. 6, on constate une relation sérologique très nette de T. 6 avec T. 2 et T. 4 mais très peu marquée avec C. 16 et BF. 29. Les constantes de vélocité calculées d'après l'équation

$$K = 2,3 \ D/t \times \log p0/p$$

dans laquelle $p0$ et p sont les titres du phage au temps 0 et au temps t , D est le facteur de dilution du sérum et t est le temps exprimé en minute, ont en effet les valeurs suivantes :

Pour T.6	K = 460
Pour T.2	K = 230
Pour T.4	K = 46
Pour C.16	K = 11,3
Pour BF.29	K = 8

La spécificité sérologique du bactériophage T. 6 est donc sous la dépendance de facteurs distincts de ceux qui déterminent sa spécificité d'action. Il n'y a donc pas de raison à ce que le bactériophage T. 6 soit sérologiquement apparenté à la colicine K.

Les bactériophages T. 6, C. 16 et BF. 29, qui appartiennent au groupe III, mais aussi les bactériophages T. 2 et T. 4, exercent tous une action bactéricide sans multiplication des particules sur la souche Co. 270 qui est cependant normalement sensible à d'autres bactériophages. Chose curieuse, ces actions bactéricides, où n'intervient vraisemblablement que le constituant de la particule de phage déterminant la spécificité d'action, sont neutralisées

par le sérum anti-T. 6 avec les mêmes constantes de vélocité que précédemment. Il est probable que les anticorps, en se fixant sur les facteurs responsables de la spécificité sérologique, masquent le facteur responsable de la spécificité d'action et l'empêchent ainsi de manifester son action bactéricide.

CONCLUSIONS.

Les colicines sont des substances antibiotiques diffusibles produites par certaines souches d'entérobactériacées, tandis que les bactériophages sont des unités biologiques transmissibles, douées de continuité génétique. Les colicines et les bactériophages sont des agents de nature essentiellement différente.

Ces deux agents offrent cependant certaines ressemblances. Les souches colicinogènes ont une distribution et un spectre d'activité comparables à ceux des souches lysogènes. Les colicines qu'elles produisent se comportent à plus d'un point de vue comme les bactériophages et agissent notamment sur les souches sensibles par l'intermédiaire de récepteurs comparables mais distincts.

Les rapports entre colicines et bactériophages ne se limitent pas toujours à de simples analogies, mais traduisent parfois des relations beaucoup plus étroites. Certaines colicines et certains bactériophages déterminés agissent en effet sur une souche sensible par l'intermédiaire d'un récepteur commun à la colicine et au phage correspondant.

Les colicines diffèrent des bactériophages du fait qu'elles ne se multiplient pas et que leur action n'est pas transmissible en série. Or certains bactériophages, notamment T. 6, exercent d'emblée, sur certaines souches, ou après inactivation U.V. sur d'autres souches, une action bactéricide qui ne s'accompagne pas de multiplication des particules et n'est par conséquent pas transmissible en série. Ils se comportent alors exactement comme des substances antibiotiques diffusibles, sauf que l'action bactéricide est liée à des particules qui se distribuent suivant la formule de Poisson.

L'action bactéricide de ces phages est une propriété distincte et indépendante de leur faculté de se multiplier. Le facteur responsable de l'action bactéricide détermine aussi leur spécificité d'action, mais non leur spécificité sérologique. Dans le cas du bactériophage T. 6 et des autres bactériophages du groupe III, le facteur responsable de l'action bactéricide a la même spécificité d'action et se fixe sur le même récepteur bactérien que la colicine K, ce qui prouve donc que ce facteur est une substance apparentée, sinon identique, à la colicine K.

L'intervention dans la constitution des particules de certains

bactériophages d'une substance produite normalement par des bactéries est évidemment susceptible d'éclairer d'un jour nouveau le problème de l'origine et de la nature des bactériophages, mais il est encore difficile d'en préciser le rôle exact. Dans la constitution des particules de phages interviennent aussi des nucléoprotéines douées de continuité génétique, de sorte que les bactériophages s'apparentent d'autre part aux virus, aux principes transformants du pneumocoque et aux gènes, tous sujets dont Craigie [9] a comparé nos connaissances fragmentaires à quelques pièces éparses d'un jeu de puzzle dont il faudra trouver et assembler les pièces manquantes pour obtenir la solution. Dans l'état actuel d'avancement de nos recherches, nous nous bornerons à conclure que les colicines représentent certainement une des pièces manquantes de ce puzzle, sans pouvoir préciser laquelle.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. H. ADAMS. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 505.
- [2] M. H. ADAMS. *Methods in med. Research*, **2**, Year Book Pub., Chicago, 1950.
- [3] C. H. ANDREWES et W. J. ELFORD. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 13.
- [4] M. P. BEUMER-JOCHMANS. *Ces Annales*, 1951, **80**, 536.
- [5] P. BORDET. *Rev. Immunol.*, 1947, **2**, 323.
- [6] P. BORDET et J. BEUMER. *Bull. Acad. Med. Belgique*, 1949, **14**, 1 ; *Rev. belge Path. Med. expér.*, 1951, **21**, 245.
- [7] Y. CHABBERT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 51.
- [8] S. COHEN et T. F. ANDERSON. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 511.
- [9] J. CRAIGIE. *Bact. Reviews*, 1946, **10**, 73.
- [10] M. DEMEREC et U. FANO. *Genetics*, 1945, **30**, 119.
- [11] R. DULBECCO. *J. Bact.* 1952, **63**, 209.
- [12] L. B. FASTIER. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 399.
- [13] R. A. C. FOSTER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 795.
- [14] P. FREDERICQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 1033, 1055, 1057, 1133 et 1189 ; 1948, **142**, 399, 403, 543, 545, 853, 855, 1076 ; 1949, **143**, 1011 et 1014 ; 1950, **144**, 297, 437, 439, 728, 730, 1287, 1707 et 1709 ; 1951, **145**, 138, 141, 930 et 1433 ; 1952, **146**, 151, 154, 298, 301 et 327 ; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 358 ; 1952, **34**, 415 ; *Schweiz. Zeitschr. Path. Bakt.*, 1946, **9**, 385 ; *Rev. belge Path. Med. exp.*, 1948, **19**, suppl. IV, 1 ; *Rev. méd. de Liège*, 1949, **4**, 193 ; *Ant. v. Leeuwenhoek*, 1950, **16**, 41 ; 1951, **17**, 102 et 227 ; *Bull. Acad. Med. Belgique*, 1950, **15**, 491.
- [15] P. FREDERICQ et M. BETZ-BAREAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1078 et 1180 ; *ces Annales* 1952, **83**, 283.
- [16] P. FREDERICQ et A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 560 ; *Ant. v. Leeuwenhoek*, 1950, **16**, 119.
- [17] P. FREDERICQ et E. JOIRIS. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 299 et 435.
- [18] P. FREDERICQ, E. JOIRIS, M. BETZ-BAREAU et A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 556.

- [19] P. FREDERICQ et M. LEVINE. *J. Bact.*, 1947, **54**, 785.
- [20] J. F. GARDNER. *Brit. J. exp. Path.*, 1950, **31**, 102.
- [21] A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 1040.
- [22] A. GRATIA. *Ces Annales*, 1932, **48**, 413.
- [23] A. GRATIA et P. FREDERICQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 1032 ; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 354.
- [24] A. GRATIA, P. FREDERICQ, E. JOIRIS, M. BETZ-BAREAU et E. WEERTS. *Ant. v. Leeuwenhoek*, 1950, **16**, 31.
- [25] E. GROSSO. *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1950, **29**, 373.
- [26] A. GUELIN. *Ces Annales*, 1943, **69**, 382.
- [27] A. GUELIN. *Ces Annales*, 1948, **75**, 472.
- [28] S. P. HALBERT. *J. Immunol.*, 1948, **58**, 153 ; **60**, 23 et 359.
- [29] S. P. HALBERT et M. GRAVATT. *J. Immunol.*, 1949, **61**, 271.
- [30] S. P. HALBERT et H. J. MAGNUSON. *J. Immunol.*, 1948, **58**, 397.
- [31] N. G. HEATLEY et H. W. FLOREY. *Brit. J. exp. Path.*, 1946, **27**, 378.
- [32] R. M. HERRIOTT. *J. Bact.*, 1951, **61**, 752.
- [33] J. LEDERBERG. *Genetics*, 1947, **32**, 505.
- [34] S. E. LURIA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1947, **33**, 253.
- [35] S. E. LURIA et M. DELBRÜCK. *Genetics*, 1943, **28**, 491.
- [36] S. E. LURIA et M. DELBRÜCK. *Arch. Biochem.*, 1942, **1**, 207.
- [37] U. MONDOLFO. *Boll. Soc. ital. Biol. sperim.*, 1948, **24**, 1 ; *Annales Med. Publ.*, 1949, **1**, 219.
- [38] U. MONDOLFO et R. CEPPELLINI. *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1950, **29**, 231.
- [39] W. H. PRICE. *J. gen. Physiol.*, 1950, **34**, 231.
- [40] W. H. PRICE. *J. gen. Physiol.*, 1950, **34**, 251.
- [41] V. SERTIC et N. A. BOULGAKOV. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 778.
- [42] J. D. WATSON. *J. Bact.*, 1950, **60**, 697 ; 1952, **63**, 473.
- [43] S. ZAMENHOFF. *J. Bact.*, 1945, **49**, 413.

COMPARAISON ENTRE LA BIOSYNTHÈSE INDUITE DE LA COLICINE ET DES BACTÉRIOPHAGES ET ENTRE LEUR MODE D'ACTION (*)

par F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN.

(Institut Pasteur. Service de Physiologie microbienne.)

INTRODUCTION.

En juin 1951, A. Lwoff émettait, au premier symposium international de chimie microbiologique, la prophétie suivante : « A côté des protéines inutiles non létales et non infectieuses, du principe transformant du pneumocoque non létalement et infectieux et des bactériophages létaux et infectieux, il y a une place théorique pour des particules dont la biosynthèse serait létale et qui ne seraient pas infectieuses » [1].

Cette hypothèse s'est trouvée vérifiée quelques mois plus tard. La souche d'*Escherichia coli* ML [2] cultivée en bouillon produit une substance antibiotique active sur certaines autres souches d'*E. coli*. Cette substance, qui ne peut être reproduite par les bactéries sensibles, appartient donc au groupe des colicines [3]. Dans les cultures de *E. coli* ML en milieu synthétique, par contre, on ne peut déceler de colicine ni dans le milieu, ni dans un broyat des corps microbiens.

Si l'on soumet une telle culture à un rayonnement ultra-violet, on observe qu'après une période de croissance résiduelle les bactéries se lysent. La synthèse de la colicine à l'intérieur des bactéries commence très tôt après l'irradiation, et se poursuit jusqu'à la lyse. C'est seulement alors que la colicine fait son apparition dans le milieu [4]. L'irradiation des bactéries ML par la lumière ultra-violette a donc induit la synthèse de la colicine qui n'est libérée dans le milieu que par la lyse des bactéries productrices.

Frédéricq et Gratia [5] ont, à juste titre, attiré l'attention sur les analogies qui existent entre bactériophages et colicines. On trouvera dans le rapport de P. Frédéricq [6] un exposé sur les rela-

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du National Cancer Institute of the National Institutes of Health des Etats-Unis d'Amérique

tions de spécificité et sur les résistances croisées observées avec ces deux agents antibactériens.

Nous nous proposons de souligner ici que ces analogies s'étendent au déterminisme et aux effets de l'induction chez les bactéries colicinogènes ML et chez les bactéries lysogènes inductibles ainsi qu'au mode d'action de la colicine et des bactériophages virulents sur les bactéries sensibles. On trouvera les détails expérimentaux dans un mémoire déjà paru [7].

BACTÉRIES COLICINOGENES ET BACTÉRIES LYSOGENES.

Les bactéries colicinogènes comme les bactéries lysogènes perpétuent héréditairement un caractère létal potentiel : chaque bactérie de la souche ML et tous les mutants dérivés de cette souche après irradiation par la lumière ultra-violette sont colicinogènes. L'expression de ce caractère peut être expérimentalement provoquée chez toutes les bactéries d'une culture : c'est le phénomène de l'induction.

I. — L'INDUCTION des bactéries colicinogènes est en tous points comparable à celle des bactéries lysogènes [8].

Elle est tout d'abord sous la dépendance de *caractères génétiques* : il existe des souches inductibles et non inductibles. C'est ainsi que la souche originale de Gratia, *E. coli* V, n'est pas inductible. L'induction d'*E. coli* ML, cependant, ne semble pas être un phénomène isolé. Un cas tout à fait analogue a été observé avec une souche de *Pseudomonas pyocyanea* qui, après irradiation par la lumière U.V., se lyse en libérant également dans le milieu une substance bactérienne active sur d'autres souches de la même espèce, la *pyocine* (expériences inédites).

L'induction dépend également des *conditions physiologiques* de la culture soumise au choc inducteur : en particulier, la carence en aliment carboné diminue fortement l'aptitude de la souche colicinogène ML.

Enfin, les *inducteurs* qui provoquent la synthèse de la colicine sont ceux qui déclenchent le développement du prophage dans une souche lysogène : les agents physiques tels que le rayonnement U.V. dont l'effet est ici aussi réversé par la lumière visible ; les composés chimiques, mutagènes ou cancérogènes tels que l'hypérite azotée, l'eau oxygénée et divers peroxydes organiques qui induisent la production des bactériophages par les bactéries lysogènes induisent aussi la formation de colicine par les bactéries ML.

II. — LES MODIFICATIONS MÉTABOLIQUES qui accompagnent la synthèse de la colicine par les bactéries colicinogènes induites

ressemblent, à bien des égards, à celles qui peuvent être constatées pendant le développement d'un bactériophage tempéré [9]. Dans les deux cas, pendant la période de latence qui précède la lyse, on observe une croissance résiduelle et une augmentation parallèle de l'intensité respiratoire. La synthèse de l'acide ribonucléique se poursuit. L'adaptation enzymatique, le développement d'un bactériophage virulent sont encore possibles.

Entre les deux cas, il existe cependant deux différences fondamentales :

1° La colicine peut être décelée dans les corps microbiens très peu de temps après l'induction, tandis que les bactériophages tempérés ne font leur apparition que vers la fin de la période latente.

2° Chez les bactéries colicinogènes induites, la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) se poursuit parallèlement à la courbe de croissance, alors que chez les bactéries lysogènes, cette synthèse est bloquée immédiatement après l'induction et ne reprend que vers le milieu de la période latente.

Il convient de rappeler que les colicines jusqu'ici étudiées [40] semblent être essentiellement de nature protéique. Le bactériophage, au contraire, comporte deux fractions, l'une désoxyribonucléique et l'autre protéique. Il est donc concevable que le blocage de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique bactérien, caractéristique du développement de tous les phages étudiés jusqu'ici [9], ne s'observe pas dans le cas de la colicine.

MODE D'ACTION DE LA COLICINE ET DU BACTÉRIOPHAGE.

Si l'induction des bactéries colicinogènes ressemble à celle des souches lysogènes, et si le retentissement de la synthèse de la colicine sur le métabolisme de la bactérie productrice est analogue à celui qui accompagne le développement d'un bactériophage tempéré, c'est plutôt l'action d'un bactériophage virulent qu'évoque l'action de la colicine sur les bactéries sensibles.

La *fixation de la colicine*, comme celle des bactériophages, requiert la présence de récepteurs spécifiques [41], et il est possible de sélectionner des mutants résistants à telle ou telle colicine [6].

Par l'étude des courbes de survie des bactéries sensibles en fonction de la concentration en colicine ML, on peut montrer non seulement que cette bactériocine est effectivement fixée par les bactéries sensibles, mais suivre également la cinétique de cette réaction. On est conduit à conclure qu'un seul événement, c'est-à-dire vraisemblablement la fixation d'une seule « particule létale », suffit à provoquer la mort d'une bactérie. La constante

d'adsorption ainsi calculée est du même ordre de grandeur que les constantes d'adsorption des bactériophages.

L'action létale de la colicine ML est extrêmement puissante et se manifeste dès l'addition de cette substance à une suspension de bactéries sensibles. Comme dans le cas des bactériophages virulents, dès la fixation de la colicine, la croissance des bactéries, l'accroissement de l'intensité respiratoire, la synthèse des acides ribo- et désoxyribonucléique sont bloqués. Enfin, l'addition de colicine à des bactéries infectées avec un bactériophage virulent arrête aussitôt le développement de ce bactériophage. La colicine inhibe donc complètement toutes les activités de synthèse des bactéries traitées, alors qu'un bactériophage virulent ne semble bloquer que celles des synthèses qui ne concourent pas à sa propre reproduction [12].

En effet, la différence fondamentale entre colicine et bactériophage virulent, c'est que la colicine tue et n'est pas reproduite, tandis qu'en règle générale, les bactériophages virulents sont reproduits par les bactéries qu'ils tuent.

DISCUSSION.

Les rapprochements qui viennent d'être faits entre souches colicinogènes et souches lysogènes d'une part, entre colicine et bactériophages virulents d'autre part, posent nettement la question des rapports pouvant exister entre ces deux catégories d'agents antibactériens.

Les principales différences entre colicines et bactériophages peuvent être résumées de la manière suivante :

1° Les colicines semblent être des protéines. Les bactériophages sont des nucléoprotéines.

2° Les colicines ne se reproduisent pas. Les bactériophages se reproduisent.

3° La colicine apparaît tôt dans la première moitié de la période latente qui suit l'induction d'une souche colicinogène. Les bactériophages apparaissent à la fin de la période latente.

4° La formation de colicine ne bloque pas la synthèse de l'acide désoxyribonucléique bactérien. Le développement des bactériophages tempérés bloque cette synthèse pendant la première moitié de la période latente.

5° La synthèse de l'acide désoxyribonucléique des bactéries sensibles traitées par la colicine est supprimée. La synthèse de l'ADN chez les bactéries infectées par un bactériophage virulent, d'abord arrêtée, reprend dans la seconde moitié de la période latente.

Il semble que la première de ces différences, la différence de

constitution chimique entre les deux agents, suffise pour rendre compte de toutes les autres. Il a été, en effet, récemment démontré qu'on peut, dans certains cas, sous l'effet du choc osmotique [13], dissocier les bactériophages T2 en leurs deux fractions protéique et désoxyribonucléique. La fraction protéique qui porte les propriétés antigéniques des bactériophages est capable de s'adsorber et de tuer les bactéries sensibles [14]. La fraction désoxyribonucléique, support de la spécificité génétique, est seule capable d'assurer la reproduction des bactériophages [15].

Quoiqu'on ne connaisse pas encore les manifestations métaboliques qui accompagnent l'effet létal de la fraction protéique, il apparaît très vraisemblable qu'elles seront comparables à l'action d'une colicine. Pour autant que l'on sache, l'enveloppe des bactériophages tempérés est dépourvue d'action létale : c'est ainsi que certains bactériophages tempérés inactivés par les rayons U.V. s'adsorbent sur les bactéries sensibles sans les tuer (F. Jacob, expériences inédites). La seule manifestation caractéristique du *développement* du bactériophage semble bien être l'*évolution* de la synthèse de l'ADN [9]. Il n'est donc pas surprenant que cette évolution caractéristique fasse défaut tant au cours de la synthèse que de l'action létale de cette protéine qu'est la colicine.

Au cours de la formation d'un bactériophage, en effet, la fusion entre la fraction protéique et la fraction désoxyribonucléique semble n'intervenir qu'à un stade tardif du développement [16]. Si l'on considère que la colicine est l'équivalent d'une protéine phagique, on comprend que son apparition soit plus précoce que celle d'un bactériophage.

Il est intéressant de signaler, pour finir, que *E. coli* ML produit également des bactériophages tempérés (E. Kellenberger [17]). Bactériophage et colicine peuvent toutefois être facilement distingués par la centrifugation différentielle, le temps de leur apparition dans les bactéries induites, l'action des enzymes protéolytiques et la différence de leurs vitesses d'adsorption (expériences inédites).

S'il était démontré qu'une parenté existe entre la colicine et le phage d'*E. coli* ML, on pourrait se demander dans quelle mesure la production de colicine ne correspondrait pas à une déviation de la synthèse de la protéine prenant part à la constitution du bactériophage.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LWOFF. *Bull. Org. Mond. Santé*, 1952, **6**, 249.
- [2] J. MONOD et A. AUDUREAU. *Ces Annales*, 1946, **72**, 868.
- [3] A. GRATIA et P. FREDERICQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 1032.
- [4] F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1500.

- [5] P. FREDERICQ et A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 560.
- [6] P. FREDERICQ. *Ces Annales*, 1953, **84**, 294.
- [7] F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 295.
- [8] A. LWOFF. *Ces Annales*, 1953, **84**, 225.
- [9] L. SIMINOVITCH. *Ces Annales*, 1953, **84**, 265.
- [10] N. G. HEATLEY et H. W. FLOREY. *Brit. J. exp. Path.*, 1946, **26**, 378.
- [11] P. BORDET et J. BEUMER. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 259.
- [12] S. S. COHEN. *Bact. Rev.*, 1949, **13**, 1.
- [13] T. F. ANDERSON. *Bot. Rev.*, 1949, **15**, 464.
- [14] R. M. HERRIOTT. *J. Bact.*, 1951, **61**, 752.
- [15] A. D. HERSHEY. *Ces Annales*, 1953, **84**, 99.
- [16] R. I. DE MARS, S. E. LURIA, H. FISHER et C. LEVINthal. *Ces Annales*, 1953, **84**, 113.
- [17] E. KELLENBERGER. Communication personnelle.

Le Gérant : G. MASSON.